Neue Tetranortriterpenoide aus Melia azedarach L. mit insektenfraßhemmender Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Bokel
aus Paderborn

1980

80 502

Neue Tetranortriterpenoide aus Melia azedarach L. mit insektenfraßhemmender Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Bokel
aus Paderborn

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1980
Dekan: Professor Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Kraus
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hanack

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kraus danke ich herzlich für die Themenstellung, für wertvolle Ratschläge, die überaus großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit und besonders für das Beschaffen von Meßzeit an Hochfeld-NMR-Geräten.

Herzlichen Dank möchte ich auch Frau G. Rissmann und Herrn Dr. P. Kunzelmann vom organisch chemischen Institut der Universität Heidelberg aussprechen für ihre Unterstützung, ebenso allen Angehörigen des Instituts für Chemie der Universität Hohenheim, insbesondere Herrn G. Schwinger für die Aufnahme von Massenspektren und Frau S. Bossert für die Durchführung der Antifeeding-Tests.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Theoretischer Teil

1 Einleitung..... 1

2 Einige Anmerkungen zur Taxonomie..... 4

3 Aufzählung der bereits in Melia azadarach L. und ihrer japanischen Varietät gefundenen Triterpenoide und ihre biogenetische Einordnung... 6

4 Triterpenoide und Scopoletin aus den Früchten von Melia azedarach L..... 14

4.1 Herkunft des Materials..... 14

4.2 Extraktion der Früchte und Abtrennung der Protolimonoide und des Scopoletins..... 14

4.3 Abschließende Bemerkungen..... 18

5 Sechs neue biogenetisch verwandte Tetranortriterpenoide aus Früchten von Melia azedarach L..... 21

5.1 Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29), der Nimbolidine A (30) und B (31), des Nimbolinins B (32) und des 1-Desacetylnimbolinins B (33)..... 21

5.1.1 Trennung der Ohchinolide von den Nimbolidinen..... 22

5.1.2 Trennung der Nimbolidine A und B..... 24

5.1.3 Trennung der Nimbolinine..... 25

5.2 Strukturaufklärung der Ohchinolide A (28) und B (29)..... 26

5.2.1 Hochauflösung und Summenformel..... 26

5.2.2 Die ^{13}C-NMR-Spektren..... 26

5.2.3 Die 300 MHz ^{1}H-NMR-Spektren..... 30

5.2.4 Die IR-Spektren der Ohchinolide..... 33

5.2.5 Die Konstitution und Konfiguration der Ringe A und B..... 33

5.2.6 Die Konstitution und Konfiguration der Ringe C und D..... 38

5.2.7 NOE-Messungen am Ohchinolid B und Zuordnung der Methylgruppen..... 47

5.2.8 Die Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale durch Selektiventkopplungen am Ohchinolid B..... 49

5.3 Strukturaufklärung der Nimbolidine..... 53

5.3.1 Hochauflösung und Summenformel der Nimbolidine (30) und (31)..... 53

5.3.2 Bestimmung von Strukturelementen an Hand von IR- ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten..... 53

5.3.3 Absicherung der Struktur und der ^{1}H-NMR- Zuordnung am Beispiel des Nimbolidin B (31)..... 59

5.3.4 Die bevorzugte Orientierung des Rings D in Lösung..... 64

5.3.5 NOE- Experimente am Nimbolidin B (31) 66

5.3.6 Überführung der Ohchinolide (28) und (29) in die Nimbolidine (30) und (31)..... 68

5.4 Strukturaufklärung des Nimbolinins B (32)..... 73

5.4.1 Bestimmung der Summenformel..... 73

5.4.2 Strukturaufklärung durch Vergleich der Protonenspektren von (32) und Heudebolin (36) und der Protonen- und ^{13}C-NMR-Spektren von (32) und (29)..... 74

5.4.3 Die Zuordnung der Signale von C-12 und C-15 beider Epimeren durch Selektiventkopplung und Bestimmung der Konfiguration an C-12..... 77

5.4.4 Das Spinsystem 9-H, 11-H$_{\alpha,\beta}$ und 12-H und die Konformation des ε-Lactols..... 81

5.4.5 Die Zuordnung des ^{13}C-NMR-Spektrums..... 86

5.5 Strukturaufklärung von 1-Desacetylnimbolinin B (33)..... 87

5.5.1 Hochauflösung und Summenformel..... 87

5.5.2 Vergleich der ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR-Spektren von (32) und (33)..... 87

5.5.3 Die Bestimmung der Position der verbleibenden Acetylgruppe und die Zuordnung der drei neuen Multipletts..... 87

5.5.4 Beeinflußung der Stereochemie des Moleküls durch die Nachbarschaft der Hydroxylgruppen an C-1 und C-12..... 90

6 Isolierung und Strukturaufklärung von 3-Tigloylohchinin (37) aus in Griechenland geernteten Früchten von Melia azedarach L..... 94

6.1 Abtrennung des 3-Tigloylohchinin von den Tetranortriterpenoiden (28) - (33)..... 94

6.2 Strukturaufklärung des 3-Tigloylohchinin (37). 95

6.2.1 Hochauflösung des M^+-Peaks und Summenformel... 95

6.2.2 Aufklärung der Struktur durch Spektrenvergleich mit dem 3-Acetylohchinin (22)..... 95

7 Überlegungen zur Biogenese der neuen Tetranortriterpenoide (28) - (33) und (37)..... 102

8 Prüfung der isolierten Tetranortriterpenoide (28) - (33) auf fraßhemmende Wirkung..... 106

8.1 Testmethode..... 106

8.2 Testergebnisse..... 106

8.3 Diskussion der Testergebnisse..... 107

9 Zusammenfassung..... 114

Experimenteller Teil

1 Verwendete Geräte..... 118

2 Pflanzenmaterial..... 119

3 Isolierung der Protoliminoide und des Scopoletins..... 120

3.1 Extraktion..... 120

3.2 Verteilungschromatographie..... 120

3.3 Säulenchromatographie der vereinigten Extrakte..... 120

3.3.1 Isolierung von Scopoletin (24) aus Fraktion 4 120

3.3.2 Isolierung von Melianon (25) aus Fraktion 5. 121

3.3.3 Isolierung von Melianol (26) aus Fraktion 6. 121

3.3.4 Isolierung von Melianodiol (27) aus Fraktion 7..... 121

4 Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29), der Nimbolidine A (30) und B (31), des Nimbolinins B (32) und des 1-Desacetylnimbolins (33)..... 122

4.1 Extraktion..... 122

4.2 Verteilungschromatographie und Aktivkohlebehandlung..... 122

4.3 Säulenchromatographie des Etherextraktes und und des Petroletherextraktes..... 122

4.3.1 Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29) 123

4.3.2 Trennung der Nimbolidine A (30) und B (31).. 124

4.3.3 Trennung des Nimbolinin B (32) und des 1-Desacetylnimbolinin B (33)..... 125

5	Isolierung des 3-Tigloylohchinin (37) aus griechischen Früchten.....	126
5.1	Chromatographie des Petroletherextraktes....	126
6.	Chemische Reaktionen zur Strukturaufklärung der Nimbolidine (30) und (31) und Ohchinolide A (28) und B(29).....	127
6.1	Überführung der Ohchinolide A (28) und B (29) in die Ringöffnungsprodukte (34) und (35)...	127
6.2	Überführung der Ringöffnungsprodukte (34) und (35) in die Nimbolidine (30) und (31)...	128
7	Chemische Reaktionen zur Strukturaufklärung des Nimbolinin B (32) und 1-Desacetylnimbolinin B (33).....	128
7.1	Oxidation des Lactols (32) zum Lacton (29)..	128
7.2	Acetylierung von (32) und (33).....	129
8	Angaben zur Dünnschichtchromatographie.....	130
	Literatur.....	131

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

Die Untersuchung von Blättern, Rinde und Früchten von Toona sureni[1], Toona ciliata var. australis[2] und Azadirachta indica[3] (Meliaceae) haben zur Isolierung und Strukturaufklärung einer Fülle von Substanzen geführt, die stark fraßhemmend auf die Larven von Epilachna varivestis Muls. wirken.

Am besten untersucht von den drei Pflanzen ist wohl Azadirachta indica, auch Neem Baum genannt, der in Indien, Ostafrika, Südpersien und Südarabien sehr verbreitet ist. Die Tatsache, daß in Blättern, Rinde und Früchten des Neem Baums Substanzen vorhanden sind, die auf viele Schadinsekten eine fraßhemmende Wirkung ausüben, hat gerade in den letzten Jahren das wissenschaftliche Interesse an dieser Pflanze angeregt. Es hat sich nähmlich gezeigt, daß der steigende Einsatz synthetischer Pestizide zu erheblichen Störungen der Ökosysteme führt und Gefahren für Mensch und Tier mit sich bringt. Andererseits kann wegen der rapiden Zunahme der Weltbevölkerung, deren Versorgung mit Nahrungsmitteln gesichert werden muß, nicht auf Maßnahmen zum Pflanzenschutz verzichtet werden. Deshalb ist es von größter Wichtigkeit, daß Alternativen zu den synthetischen Insektiziden gefunden werden. Besonders in den Entwicklungsländern, denen ohnehin die finanziellen Möglichkeiten zum Kauf von synthetischen Pestiziden fehlen, werden daher Versuche unternommen, bei denen Rohextrakte aus Neemfrüchten und -blättern zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt werden. Die Vielzahl der zur Zeit laufenden Forschungsprojekte ließ eine Koordinierung notwendig erscheinen, wie sie Anfang dieses Jahres versucht wurde[4].

Weit weniger Aufmerksamkeit findet Melia azedarach L., deren Untersuchung das Thema dieser Arbeit ist. Wegen ihres ähnlich klingenden Namens wird sie in der Literatur häufig mit Melia azadirachta, ein anderer Name für den Neem Baum, verwechselt. Die Heimat von Melia azedarach L., auch China Tree, Umbrella Tree, Paternosterbaum, persischer Flieder etc. genannt, ist vermutlich Persien und Kleinasien[5]. Im Gegensatz zum Neem Baum ist sie jedoch auch auf dem europäischen Festland, besonders im Mittelmeerraum anzutreffen. Sie dient hier vor allem als Zierbaum und wird z.B. in Griechenland, wo man sie "Melia, die Asiatische" nennt, in Parkanlagen, Friedhöfen und als Alleebaum angepflanzt und kultiviert. Während in Europa sich die Bedeutung der Pflanze in ihrer Nutzung als Zierbaum erschöpft, wird sie in Indien und Afrika als Bauholz und vor allem als Arzneidroge genutzt. Die Wertschätzung, die sie hier genießt, wird durch die Einreihung in die heiligen Bäume und Pflanzen dokumentiert. Verschiedenste Wirkungen werden beschrieben[5]. So soll ein in der Wurzelrinde enthaltenes Harz gegen Verwurmung wirken. Der Wurzelrinde selbst werden fiebersenkende und antiseptische Wirkungen zugeschrieben. Aus Melia azedarach L. var. japonica Makino wurde eine Droge isoliert, die Santonin-ähnliche (Santonin: wirksames Mittel gegen Spulwürmer) Eigenschaften besitzen soll. Die Blätter sind im arabisch-persischen Raum für ihre vermifuge ("würmervertreibend") und diuretische Wirkung bekannt. Auf Madagaskar werden wässrige und alkoholische Auszüge der Früchte als fiebersenkende Mittel verwendet. Auch als Antihelminticum (Wurmmittel) werden die Früchte genutzt.

Die uns besonders interessierenden insectifugen Eigenschaften wurden schon vor mehr als dreißig Jahren erwähnt[6)7)]. Von Melia azedarach und Melia azadirachta war beispielsweise bekannt, daß sie von der Wüstenheuschrecke Shistocerca gregaria Forsk nicht geschädigt werden. Als aktives Prinzip sowohl in den Früchten von Melia azeda-

rach, wie auch im Samenöl (Neemöl) von Melia azadirachta wurde Meliantriol gefunden[8]. In geringen Mengen scheint auch das Azadirachtin, das zuerst aus den Früchten von Melia azadirachta isoliert wurde[9] und dessen Struktur von K. Nakanishi und Mitarbeitern aufgeklärt wurde[10], in den Früchten von Melia azedarach vorhanden zu sein[11].

Diese Beispiele zeigen, daß alle Pflanzenteile Substanzen enthalten müssen, die nicht nur fraßhemmende, sondern auch vielfältige pharmakologische Wirkungen besitzen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung und Strukturaufklärung neuer biologisch aktiver Inhaltsstoffe. Hierbei steht zunächst die fraßhemmende Wirkung im Vordergrund. Fraßtests mit dem mexikanischen Bohnenkäfer Epilachna varivestis Muls. dienten während der Isolierung als wirksame Methode zur Identifizierung der aktiven Substanzen[12].

2. Einige Anmerkungen zur Taxonomie

Das folgende Schema (Schema 1) zeigt die systematische Einteilung von Melia azedarach L.[13)]

Schema 1:

XVII Abteilung:	Die Bedecktsamer (Angiospermae)
1. Klasse:	Die Zweikeimblättrigen (Dycotyledonae)
1. Unterklasse:	Einfachblumenblättrige und Freiblumenblättrige.
27. Reihe:	Rautenpflanzen (Rutales)
1. Unterreihe:	Rutineae
Familie:	Rautengewächse (Rutaceae)
1. Unterfamilie:	Rautenartige (Rutoideae)
2. Unterfamilie:	Zitronenartige (Citroideae)
Familie:	Bittereschengewächse (Simarubaceae)
Familie:	Balsambaumgewächse (Burseraceae)
Familie:	Zedrachgewächse (Meliaceae)

Cedreloideae | Swietenoideae | Melioideae

Melia azedarach L.

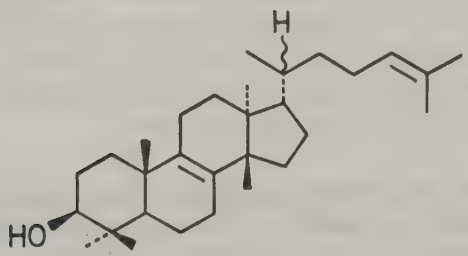
Das äußere Erscheinungsbild der Pflanze wird in der Literatur[14) 15)] wie folgt beschrieben:
Der bis zu 15 m hoch werdende Baum ist an seinen meist zweifach gefiederten, großen Blättern erkennbar. Die gezähnten Fiedern sind eiförmig bis lanzettlich ausgebildet. Auffallend sind die locker verzweigten Blütenstände mit kleinen, zerbrechlich aussehenden, hellblau bis violetten Einzelblüten, die einen angenehmen Duft verströmen. Fünf nicht miteinander verwachsene Sepalen umhüllen die gleiche Anzahl sternförmig ausgebreiteter Kronblätter, die wiederum einen violetten Staminaltubus mit zehn Staubblättern einschließen. Aus dem oberständigen, fünffächrigen Karpell mit ein bis zwei Samenanlagen gehen beerenartige Steinfrüchte von gelber bis bräunlicher Farbe mit fleischiger Außenwand und holzigem Endocarp hervor. Eine krustige, schwarze Schale umgibt die Samen.

Auch von der japanischen Varietät Melia azedarach var. japonica Makino, die intensiv von Ochi und Mitarbeitern bearbeitet wird, ist eine sichere Unterscheidung durch die Größe der Früchte möglich[15)]. Während die Früchte der von mir untersuchten Varietät atwa einen Durchmesser von ein bis drei cm erreichen und ihre Samen in vier bis fünf Fächern enthalten sind, werden die der japanischen Varietät bis zu vier cm groß und besitzen sechs bis acht Fächer.

Das untersuchte Pflanzenmaterial stammt aus Jugoslawien (Osor und Porec) und Griechenland (Athen). Es wurde im Oktober geerntet, deshalb konnten nur Rinde, Blätter und Früchte zur Zuordnung verwendet werden. Der Vergleich der Pflanzenteile mit entsprechenden Abbildungen und das gesamte Erscheinungsbild der Bäume ließ jedoch eine sichere Zuordnung zu.

3. Aufzählung der bereits in Melia azedarach L. und ihrer japanischen Varietät gefundenen Triterpenoide und ihre biogenetische Einteilung

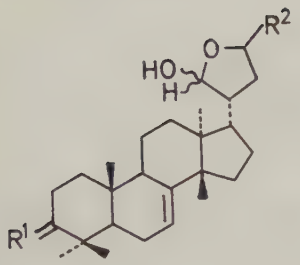
Die Einteilung der bereits in Melia azedarach L. gefundenen Triterpenoide kann nach ihrer vermuteten Biogenese aus dem durch Cyclisierung von Squalenepoxid in seiner Sessel-Sessel-Sessel-Boot-Konformation und weiteren Umwandlungen entstehenden Tirucallol (Euphol) (1) vorgenommen werden[16].

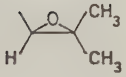
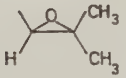
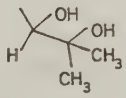
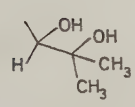


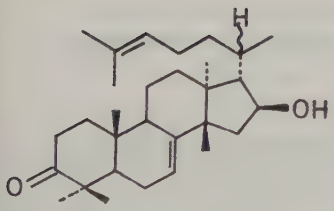
(1) : $H^{20\alpha}$ ($H^{20\beta}$)

Triterpenoide des Tirucalloltypus sind das in den Früchten und Blättern gefundene Melianon (2), Melianol (3), Melianodiol (4) und Melianotriol (5)[17) 8]. Die Doppelbindung ist hier von Δ-8 nach Δ-7 verschoben.

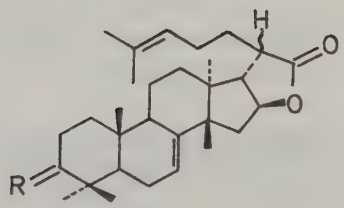
Ebenfalls das Tirucallol-(Euphol-)Skelett, jedoch einen geringeren Oxidationsgrad der Seitenkette besitzen die aus der Rinde isolierten Substanzen Kulinon (6), Kulacton (7), Kulolacton (8) und Methylkulonat (9)[18)19)].



	R^1	R^2
(2):	O	
(3):	β-OH	
(4):	O	
(5):	β-OH	

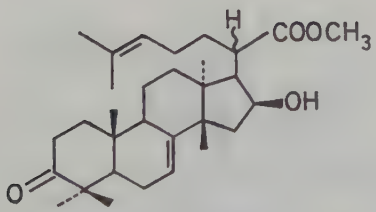


(6)



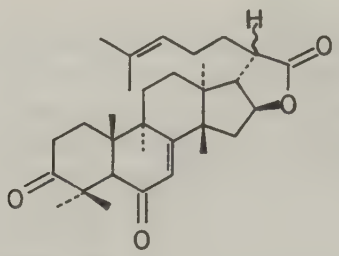
(7) R = O

(8) R = H, α-OH



(9)

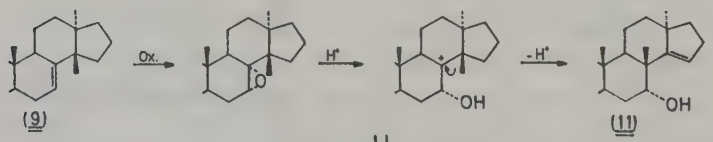
In der variatio japonica Makino wurde ein "6-Oxo-Kulacton" gefunden, das von den Autoren Sendanolacton (10) genannt wurde[20].



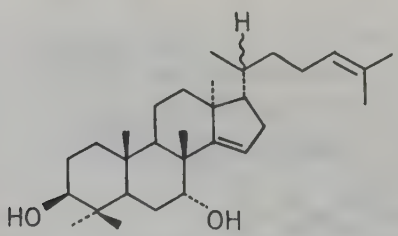
(10)

Der Übergang vom intakten Tirucallol-(Euphol-)Gerüst, wie es z.B. in (9) vorliegt, zum Apotirucallol-(Apoeuphol-) Gerüst (11) mit 7-α-Hydroxygruppe verläuft über die Epoxidierung der Δ-7-Doppelbindung, Angriff eines Protons, Wanderung der Methylgruppe von C-14 nach C-8 und Verlust von 15-H (Schema 2).

Schema 2: Umwandlung des Tirucallol-(Euphol-)gerüsts in das Apotirucallol-(Apoeuphol-)Gerüst.

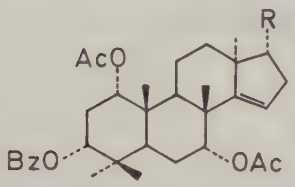


(9) (11)

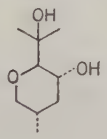


(11) : $H^{20\alpha}$ ($H^{20\beta}$)

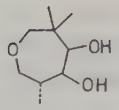
Von dieser Stufe sind aus dem Kernholz von Melia azedarach Melianin A (12) und B (13)[21] und aus den Früchten die Verbindung (14) bekannt[22].

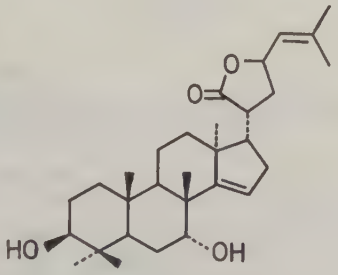


(12): R =



(13): R =

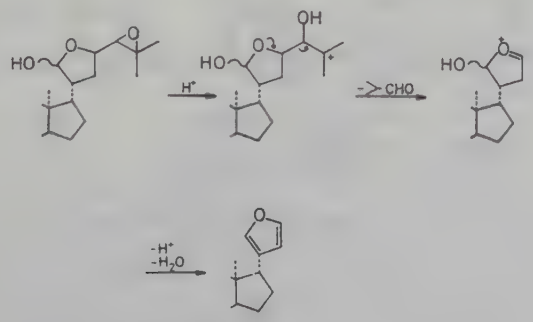




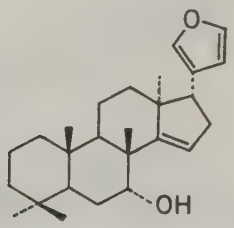
(14)

Hat die Seitenkette einen Oxidationsgrad wie beim Melianon erreicht, wo der Furanring gleichsam "in situ" vorhanden ist, kann man sich den weiteren Abbau folgendermaßen vorstellen[23]:

Schema 3: Abbau der Seitenkette beim Melianon.

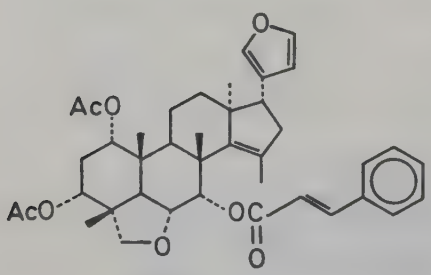


Ausgehend von Verbindungen mit einer Seitenkette des Melianontyps konnte dieser Abbau experimentell nachvollzogen werden[24]. Nach der Wanderung der Methylgruppe von C-14 nach C-8 und dem Abbau der Seitenkette ist man beim Meliacangerüst (15) angelangt, das allen in Meliaceen vorkommenden Tetranortriterpenoiden zu Grunde liegt.

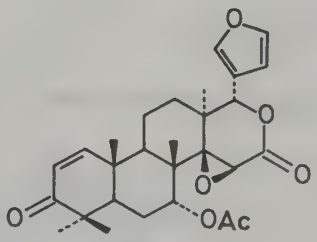


(15)

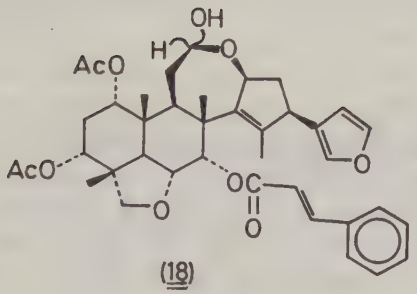
In Melia azedarach sind sowohl Tetranortriterpenoide mit intaktem tetracyclischem System als auch solche mit aufgespaltenem Ring C gefunden worden. Nimbolin A (16) und Gedunin (17)[25] aus dem Kernholz besitzen beispielsweise ein intaktes Ringgerüst, während beim Nimbolin B (18)[25] der Ring C geöffnet ist.



(16)

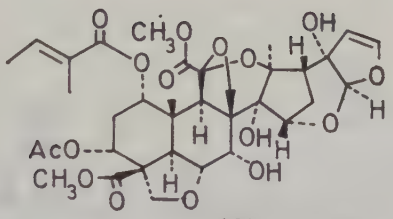


(17)



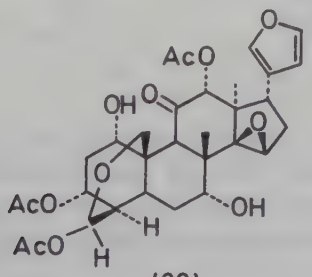
(18)

Morgan et al. geben an, auch Azadirachtin (19) gefunden zu haben[11].



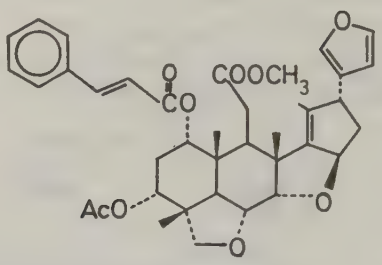
(19)

Ochi und Mitarbeiter isolierten aus der japanischen Varietät nach Acetylierung eines Substanzgemisches das Sendanin (20)[26], in dem die Methylgruppe H-19 zur Oxomethylgruppe aufoxidiert ist umd mit der zum Aldehyd oxidierten Methylgruppe H-29 einen Halbacetalring bildet.



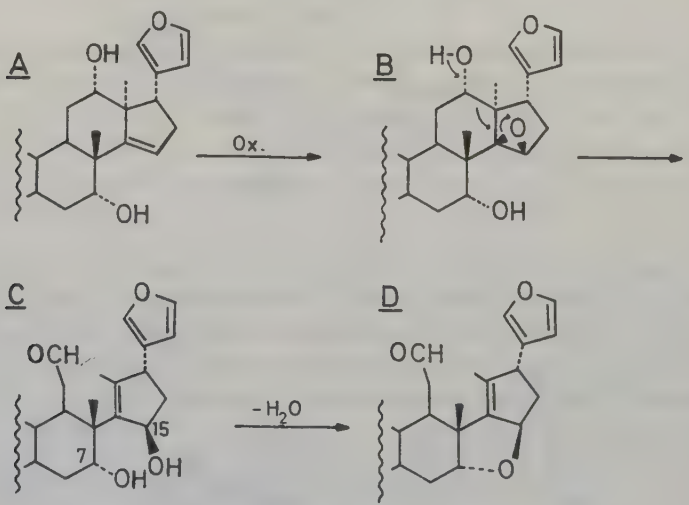
(20)

Auch ein Salanninderivat, das Ohchininacetat (21) wurde von ihnen gefunden[27].



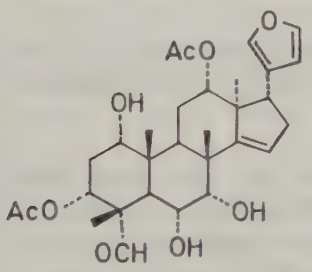
(21)

Zur Biogenese der C-seco-Tetranortriterpenoide vom Salannintyp entwickelten sie folgende Hypothese[28] (Schema 4):

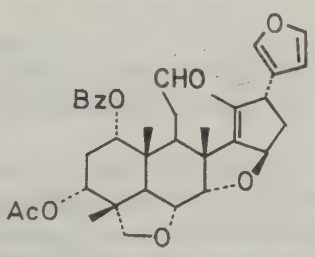


Ausgehend von einem Vorläufer mit α-ständigen Hydroxylgruppen an C-12 und C-7 und Δ-14-Doppelbindung (Teilstruktur A) entsteht durch Oxidation B mit β-ständigem 14,15-Epoxidring. Hieraus bildet sich durch Fragmentierung C.

Etherbildung zwischen C-7 und C-15 ergibt schließlich D. Die Konfiguration an C-7, C-15 und C-17 in Teilstruktur D entspricht der bei Salannin- und Nimbinderivaten gefundenen. Die Autoren führen als Beweis für ihre Hypothese an, daß sie in der gleichen Pflanze (Melia Azedarach L. var. japonica Makino) sowohl ein Tetranortriterpenoid gefunden haben, das Teilstruktur A besitzt, das Sendanal (22)[26], wie auch eines mit Teilstruktur D, das Ohchinal (23)[27].



(22)



(23)

Mit dieser Hypothese kann jedoch die Biogenese des Nimbolin B (18), bei dem sowohl die Sauerstoffunktion an C-15, wie auch der Furanring β-ständig sind, nicht erklärt werden.

4. Triterpenoide und Scopoletin aus den Früchten von Melia azedarach L.

4.1 Herkunft des Materials

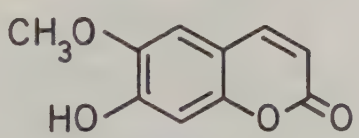
Zu Beginn dieser Arbeit wurden Früchte untersucht, die aus Osor, Jugoslawien, stammten und im Oktober geerntet worden waren.

4.2 Extraktion der Früchte und Abtrennung der Protolimonoide und des Scopoletins

In diesem Vorversuch, der dazu diente, die Arbeitstechniken zu erlernen, wurde ausschließlich mit offenen Säulen gearbeitet. 6 kg getrocknete und gemahlene Früchte wurden mit Petrolether (30 - 50°C) 48 h lang nach dem Soxhlet-Verfahren extrahiert. Der Rohextrakt (214 g) wurde einer Flüssig-Flüssig-Verteilung im System Petrolether/ Methanol/ Wasser (50:45:5) unterworfen. Der Rückstand der Petroletherphase (182.7 g) bestand vor allem aus Fetten und Ölen und wurde verworfen. In der Methanolphase waren Wachse, Sterole und Triterpenoide gelöst. Es blieben nach dem Abziehen des Methanols 31.3 g Rückstand.

Die bereits mit Petrolether extrahierten Früchte wurden anschließend 48 h lang mit Ether nach dem Soxhlet-Verfahren extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Ethers blieben 77 g zurück, die mit dem Rückstand der Methanolphase vereinigt wurden. Die chromatographische Trennung ergab neben Fetten und Wachsen (6.9 g), die verworfen wurden, insgesamt 7 sterol- und terpenoidhaltige Fraktionen. Die Fraktionen 2 und 3, zusammen 11.4 g, enthielten vor allem Sterole und Pigmente, die sich im Fraßtest als unwirksam erwiesen und deshalb nicht weiter untersucht wurden.

Fraktion 4 (12.6 g) enthielt eine unter UV-Licht intensiv bläulich fluoreszierende Substanz. Zur weiteren Anreicherung wurde an 420 g Kieselgel chromatographiert mit Petrolether/ Essigester im Verhältnis 1:1 als Fließmittel. Es wurden drei Fraktionen erhalten, von denen die polarste (1.3 g) die Substanz enthielt. Der Destillationsrückstand wurde in Aceton aufgenommen, wobei sich gelbliche Kristalle abschieden. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton verblieben 50 mg reine Kristalle vom Schmelzpunkt 202°C und der Masse 192. Die Substanz wurde durch den Vergleich der MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Spektren mit denen der Literatur[29)30)] als 6-Methoxy-7-hydroxycoumarin (Scopoletin) (24) identifiziert.

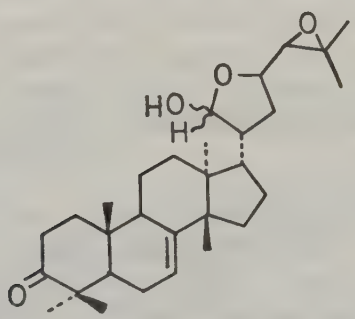


(24)

Von dem ebenfalls natürlich vorkommenden Isoscopoletin (6-Hydroxy-7-methoxycoumarin) läßt sich die Substanz durch das ^{1}H-NMR-Spektrum und den Schmelzpunkt eindeutig unterscheiden. Scopoletin wurde bisher zusammen mit Isoscopoletin und Aesculetin (6,7-Dihydroxycoumarin) nur in den Blättern von Melia azedarach L. gefunden[31)]. Die Coumarine, also Substanzen, die einen 2H-1-Benzopyran-2-on-Kern haben, kommen besonders häufig und in großer Vielfalt in den Umbelliferen und Rutaceen vor. In Meliaceen sind dagegen bisher nur wenige Derivate gefunden worden[32)33)34)]. Den Coumarinen werden toxische Wirkungen auf Tiere zugeschrieben. Sie sollen beispielsweise antibakteriell wirken, Leberschäden verursachen und gefäßerweiternd wirken. Sogar fraßhemmende Eigenschaften sollen Vertreter dieser Stoffklasse besitzen.

Im Gegensatz zum Bergapten, ein Coumarinderivat, das in den Früchten von Toona ciliata nachgewiesen wurde[35], besitzt das Scopoletin, wie ein Fraßtest mit dem mexikanischen Bohnenkäfer zeigte, keine fraßhemmenden Eigenschaften.

Aus Fraktion 5 kristallisierte beim Einengen Melianon (25) in weißen Schuppen aus.

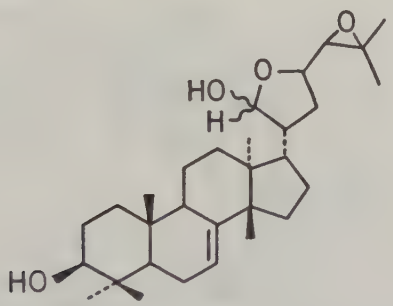


(25)

Umkristallisation aus Aceton ergab 4.2 g, Schmelzpunkt 212 - 214°C, α_D^{21} = - 65.1° ($CHCl_3$, c = 1). In der Literatur differieren die Schmelzpunktsangaben stark. Lavie, der Melianon zum ersten Mal aus Melia azedarach L. isolierte[17], gibt zwei Schmelzpunkte an: 223 - 224°C (Aceton-Pentan) und 232 - 233°C (Chloroform-Pentan). Aus den Früchten von Melia azedarach L. variatio japonica Makino wurde ebenfalls Melianon isoliert, das einen Schmelzpunkt von 220 - 223°C (Aceton) besitzt[36]. An anderer Stelle[37] wird die Isolierung von Melianon aus Simarouba amara (Simaroubaceae) beschrieben. Hier wird ein Schmelzpunkt von 212 - 214°C (Chloroform-Pentan) angegeben. Erklärt werden können die unterschiedlichen Literaturwerte durch eine Epimerisierung an C-21, die in Abhängigkeit vom jeweiligen Lösungsmittel beim Umkristallisieren zu unterschiedlichen

Mischungsverhältnissen der beiden Epimeren im Festkörper führt[38]. Deshalb wurde die Substanz noch aus anderen Lösungsmitteln umkristallisiert. Der Schmelzpunkt veränderte sich jedoch nicht. Die übrigen physikalischen Daten IR, MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR (Tab. 1) entsprechen den Literaturangaben[17)37)].

Die folgende nur wenig polarere Fraktion 6 enthielt Melianol (26).

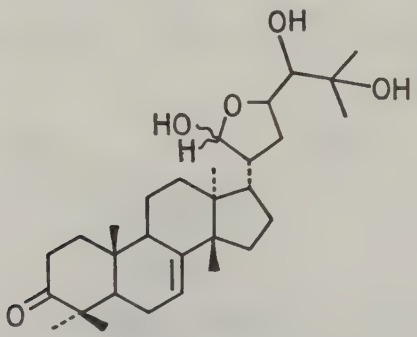


(26)

Reinigung der noch stark verunreinigten Rohfraktion (4.55 g) durch Säulenchromatographie mit Ether/ Isopropanol (98:2) als Fließmittel ergab nach Umkristallisation aus Methanol 200 mg (26), Schmelzpunkt 188 - 189°C, α_D^{21} = - 41.2° ($CHCl_3$, c = 1). Die Substanz konnte nicht völlig von unpolaren Verunreinigungen befreit werden. Deshalb weicht der Schmelzpunkt von den Literaturwerten ab[17]. Alle anderen physikalischen Daten, ^{13}C-NMR (Tabelle 1), ^{1}H-NMR, IR und MS stimmen jedoch mit den publizierten Daten überein.

IR, MS und ^{1}H-NMR eines durch Reduktion von Melianon mit $NaBH_4$ erhaltenen Syntheseprodukts[39] (Schmp.: 194°C, α_D^{21} = - 37.6° ($CHCl_3$, c = 1) stimmen ebenfalls mit den Spektren des Naturprodukts überein.

Aus den polarsten Fraktionen, die mit Methylenchlorid/ Essigester/ Methanol im Mischungsverhältnis 90:5:5 eluiert wurden, konnte schließlich nach weiterer chromatographischer Trennung Melianodiol (27), Schmp.: 222 - 224°C, α_D^{21} = - 10.7° ($CHCl_3$, c = 1.0) isoliert werden.



(27)

Auch hier konnte die Struktur durch Vergleich der physikalischen Daten mit den Literaturwerten und mit einem aus dem Melianon durch saure Öffnung des Epoxidrings erhaltenen Syntheseprodukt[39] bewiesen werden.

4.3 Abschließende Bemerkungen

Zu Beginn dieser Arbeit waren aus den Früchten von Melia azedarach L. vor allem Triterpenoide isoliert worden mit intaktem Euphanskelett und Apoeuphangerüst mit noch nicht zum Furanring abgebauter Seitenkette. Der Grund hierfür liegt meiner Ansicht nach in der Verwendung offener Säulen oder präparativer Dünnschichtchromatographie, bei denen die Substanzen zu lange auf dem Kieselgel verbleiben. Empfindliche Verbindungen werden hierbei zerstört. Die in dieser Arbeit isolierten Triterpenoide vom Tirucallol-(Euphol-)Typ sind durchweg wesentlich stabiler in Lösung, als die im folgenden beschriebenen Tetranortriterpenoide. Diese konnten auf die in diesem Kapitel beschriebene Weise nicht isoliert

werden. Sie konnten auch nach ihrer Isolierung mit geeigneteren Methoden in den verbliebenen Fraktionen des Vorversuchs nicht mehr nachgewiesen werden. Im übrigen reicht die Bodenzahl auch gut gepackter offener Säulen, bedingt durch die Teilchengröße des verwendeten Chromatographiematerials, und der zu großen Teilchendurchmesser, nicht aus, um komplizierte Substanzgemische effektiv zu trennen.

Tabelle 1: ^{13}C-NMR-Spektren von Melianon (25), Melianol (26)[a] und Melianodiol (27), (22.63 MHz, $CDCl_3$), δ-(ppm), bezogen auf das linke $CDCl_3$-Signal, δ78.52 .

C-Atom	(25)	(26)	(27)
1	38.42 t	38.68 t	37.11 t
2	35.04 t	35.23 t	23.92 t
3	216.79 s	217.05 s	79.05 d
4	47.78 s	47.97 s	38.87 s
5	52.33 d	52.59 d	50.31 d
6	24.44 t	24.51 t	23.92 t
7	117.98 d	118.24 d	118.11 d
8	145.74 / 145.61 s	145.81 s	145.61 / 145.42 s
9	49.47 / 48.30 d	48.49 d	49.47 / 48.75 d
10	34.77 s	35.23 s	34.91 s
11	17.68 t[b]	17.81 t	17.55 t
12	35.04 t	35.03 t	34.91 t
13	43.49 s	43.62 s	43.62 s
14	50.70 s	50.90 s	50.90 s
15	34.19 t	34.32 t	34.19 t
16	31.46 t	32.20 t	31.72 t
17	31.24 / 46.90 d	46.48 d	31.46 / 46.93 d
18	45.11 / 12.61 q	12.87 q	45.05 / 13.00 q

C-Atom	(25)	(26)	(27)
19	19,18 q^{+}	17.81 q^{+}	19.11 q
20	33.80 d	31.59 d	33.80 d
21	101.73 d 97.64	102.38 d	101.60 d 97.64
22	24.83 t	27.36 t	27.24 t
23	78.33 d 76.84	75.08 d	87.33 d 76.77
24	67.74 d 65.39	78.79d	67.80 d 65.46
25	57.85 s 57.14	73.72 s	57.92 s 57.27
26	24.83 q^{++}	26.85 q^{++}	24.90 q^{++}
27	19.18 q^{++}	27.56 q^{++}	19.37 q^{++}
28	22.49 q^{++}	23.24 q^{++}	22.50 q^{++}
29	24.31 q^{++}	24.64 q^{++}	27.50 q^{++}
30	21.52 q^{+}	21.65 q^{+}	14.69 q

$^{+}$),$^{++}$) Zuordnung unsicher

a) Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich mit dem ^{13}C-NMR des Turraeanthin ("3-Acetylmelianol")[37].

b) Aufgrund der Aufspaltung des Signals im "off-resonance"-Spektrum (Triplett) wird dies Signal anders als in Lit.[37] C-11 zugeordnet.

5. Sechs neue biogenetisch verwandte Tetranortriterpenoide aus Früchten von Melia azedarach L.

5.1 Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29), der Nimbolidine A (30) und B (31), des Nimbolinins B (32) und des 1-Desacetylnimbolinins B (33).

Die Extraktion des Pflanzenmaterials erfolgte wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Zur Entfernung der Pigmente wurde der nach dem Eindampfen verbliebene grün gefärbte Rückstand des Etherextraktes (34.2 g) in 1 Liter Methanol aufgenommen, mit 15 g Aktivkohle versetzt und 0.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindestillieren blieb ein brauner Festkörper (28 g) übrig, der an 1.5 kg Kieselgel chromatographiert wurde. Von den ersten zwei Fraktionen, die mit Petrolether/ Essigester (70:30 bzw. 50:50) eluiert wurden, zeigten 0.1% Lösungen keine fraßhemmende Wirkung. Sie wurden deshalb nicht weiter untersucht. Fraktion 3 hingegen, mit Petrolether/ Essigester (30:70) eluiert, bewirkte in gleicher Konzentration volle Fraßhemmung bei Epilachna varivestis.

Vom Petroletherextrakt wurden, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, durch Flüssig-Flüssig-Verteilung die Fette und Öle abgetrennt. Die methanolische Phase ergab 21 g Destillationsrückstand, dessen Chromatographie an 1.5 kg Kieselgel 7 Fraktionen lieferte. Die Fraktionen 1 und 2, mit Petrolether/ Essigester (95:5) eluiert, enthielten Fette und Wachse. Sie besaßen ebenso wie die Fraktionen 3 und 4, die mit Petrolether/ Essigester (70:30) eluiert wurden, und die Fraktion 5, mit auf 50% erhöhtem Essigesteranteil eluiert, keine fraßhemmende Wirkung. Die weitere Erhöhung der Fließmittelpolarität auf ein Verhältnis Petrolether/ Essigester (30:70) ergab Fraktion 6 und 7, die beide im Fraßtest in 0.1% Lösung volle fraßhemmende Wirkung auf Epilachna varivestis ausübten.

5.1.1 Trennung der Ohchinolide von den Nimbolidinen

Fraktion 3 (Etherextrakt) und 7 (Petroletherextrakt) waren sowohl nach dem analytischen Hochdruckflüssigkeitschromatogramm (Abb. 1), als auch dünnschichtchromatographisch ähnlich und wurden vereint.

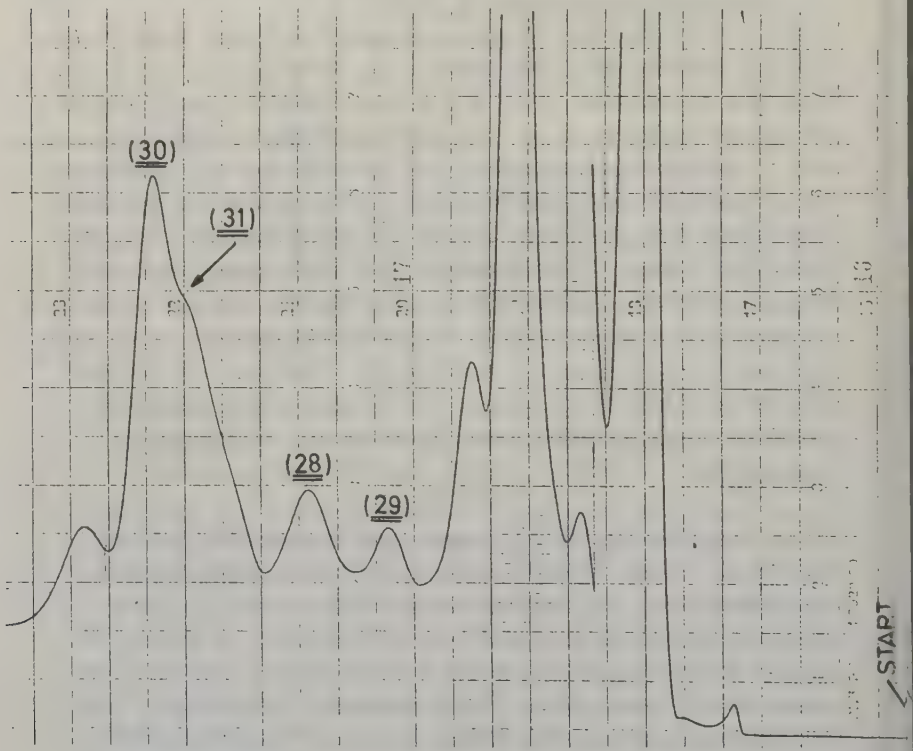


Abb. 1: Analytisches HPLC von Fraktion 7 (Petroletherextrakt). Säule: Knauer Fertigsäule gepackt mit LiChrosorb RP-18, 10 µ. Fließmittel: Methanol/ Wasser (70:30). Durchfluß: 1.5 ml/min. Druck: 40 Bar. Detektion: UV, 217 nm.

Aus dem in Abbildung 1 gezeigten analytischen Hochdruckflüssigkeitschromatogramm geht hervor, daß eine Trennung von (28) und (29) durch "reversed phase" Chromatographie mit Methanol/ Wasser (70:30) gelingt. Vor der Substanzaufgabe auf die Hochleistungssäule wurde zur Entfernung noch vorhandener unpolarer Bestandteile eine "Filtration" über eine Vorsäule durchgeführt, die mit 100 g RP-18 gefüllt war. Als Fließmittel diente Methanol/ Wasser (70:30).

Die eigentliche Trennung erfolgte dann durch präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer 125 g LiChroprep RP-18, 25 - 40 µm (Merck) enthaltenden Säule (N_{Th} = 4500/ 40 cm). Dem analytischen Chromatogramm entsprechend wurde zunächst (29) eluiert. Das Ohchinolid B (29) kristallisierte aus Methanol in farblosen Prismen aus. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurden 170 mg erhalten. (Schmp. 211 - 212°C; α_D^{20} = - 46.5°, $CHCl_3$, c=1.0). Anschließend wurde das Ohchinolid A (28) eluiert, das ebenfalls in farblosen Prismen aus Methanol kristallisierte und einen Schmelzpunkt von 230 - 231°C besaß. α_D^{20} = - 42.50 ($CHCl_3$, c=1.0). Hiervon konnten 160 mg Reinsubstanz erhalten werden.

Die etwas ungewöhnliche Nomenklatur stammt von Masamitzu Ochi[40], der die beiden Tetranortriterpenoide gleichzeitig isolierte. Die Arbeitsgruppe von M. Ochi untersucht die Inhaltsstoffe von Melia azedarach L. variatio japonica Makino, die in Japan auch Ohchi genannt wird.

Als letzte Fraktion wurden 700 mg eines Gemisches zweier Tetranortriterpenoide isoliert, die durch "reversed phase" Chromatographie nicht zu trennen waren. Abbildung 2 zeigt das analytische Hochdruckflüssigkeitschromatogramm des Gemisches mit Methanol/ Wasser (70:30) als Fließmittel und LiChrosorb RP-18, 10 µ (Merck) als stationäre Phase, und Abbildung 3 die gleiche Probe mit Methylenchlorid/ Essig-

ester (80:20) als Fließmittel und LiChrosorb Si 60, 7 µ als stationäre Phase.

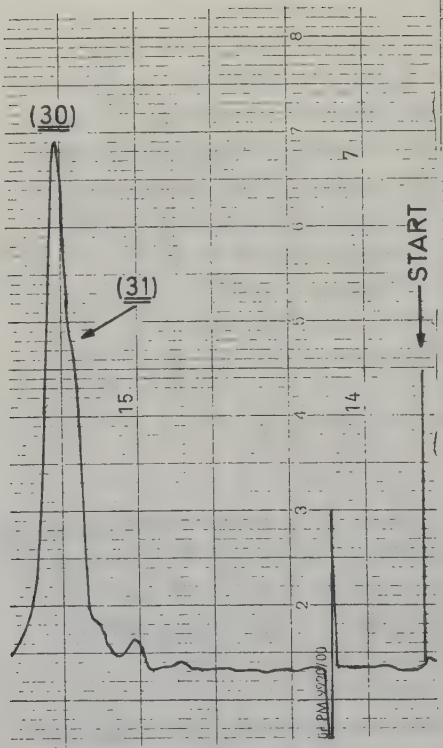


Abb. 2

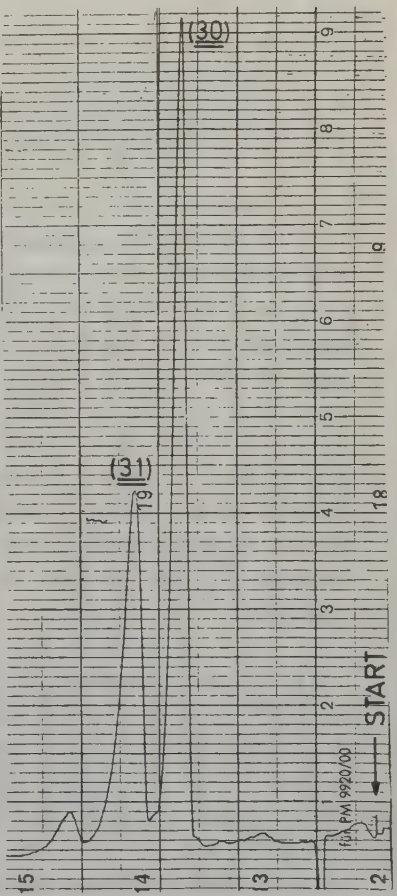


Abb. 3

5.1.2 Trennung der Nimbolidine A (30) und B (31)

Eine Trennung des Substanzgemisches gelang mit dem gleichen wie in Abbildung 3 beschriebenen System. Die Trennsäu-

le wurde mit LiChrosorb Si 60, 10 µ (Merck) gepackt und wies eine Bodenzahl von N_{Th} = 12 000/ 25 cm auf. Beide Substanzen kristallisierten aus Methanol aus. Es wurden als Reinsubstanzen nach weiteren Reinigungsoperationen 160 mg Nimbolidin A (30) erhalten, das aus Methanol in Plättchen auskristallisierte und einen Schmelzpunkt von 178°C aufwies, (α_D^{20} = - 32°, $CHCl_3$, c=1) und 280 mg Nimbolidin B (31) mit einem Schmelzpunkt von 180°C (α_D^{20} = - 9.2°, $CHCl_3$, c=1.0). Die Bezeichnungen der beiden neuen Tetranortriterpenoide wurde wegen der Beziehung ihrer Strukturen zum Nimbolin A gewählt.

5.1.3 Die Trennung der Nimbolinine

Von Fraktion 6 aus dem Petroletherextrakt wurden ebenfalls durch Filtration über eine kleine mit 100 g RP-18 gefüllte Säule die unpolaren Inhaltsstoffe abgetrennt. Nach dem Abziehen des Fließmittels blieben 740 mg angereicherte Terpenoidfraktion zurück, die die schon isolierten Nimbolidine und zwei weitere Tetranortriterpenoide enthielt. Diese konnten voneinander durch zweimalige präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie an LiChroprep Si 60, 15 - 25 µ und Methylenchlorid/ Ethanol (98.5: 1.5) als Fließmittel, gefolgt von einer Chromatographie an derselben Trennsäule, jedoch mit Methylenchlorid/ Essigester (70:30) als Fließmittel, getrennt werden. Weitere Reinigungsoperationen waren erforderlich, bis beide Substanzen in ausreichender Reinheit, jedoch nicht kristallin vorlagen. Die eine, die einen Drehwert von α_D^{20} = - 55.5° ($CHCl_3$, c=1) besitzt, wurde Nimbolinin B (32) genannt in Anlehnung an das von Ekong isolierte Nimbolin B (18), von dem es sich ableitet, wie sich später herausstellte. Der polarere Begleiter war das 1-Desacetylnimbolinin B (33) (α_D^{20} = - 48.8°, $CHCl_3$, c=1).

5.2 Strukturaufklärung der Ohchinolide A (28) und B (29)

5.2.1 Hochauflösung und Summenformel

Die Hochauflösung des M^+- Peaks[41] ergab für das Ohchinolid A die Masse $\frac{m}{e}$ = 646.2771 . Daraus folgt die Summenformel $C_{37}H_{42}O_{10}$ (berechnete Masse $\frac{m}{e}$ = 646.2777). Für das Ohchinolid B folgt aus dem Ergebnis der Hochauflösung des M^+- Peaks ($\frac{m}{e}$ = 624.2935) eine Summenformel von $C_{35}H_{44}O_{10}$ (berechnete Masse $\frac{m}{e}$ = 624.2934).

5.2.2 Die ^{13}C-NMR-Spektren

Von beiden Substanzen wurden PND- und Off-Resonance ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen[42], vom Ohchinolid A zusätzlich ein gekoppeltes Spektrum nach der Gated Decoupling Methode[43] (Tabelle 8). Abbildung 4 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum von Ohchinolid A und Abbildung 5 das des Ohchinolid B. Bis auf wenige Signale gleichen sich die Spektren der beiden Ohchinolide stark. In Tabelle 2 sind die chemischen Verschiebungen dieser Signale zusammengestellt.

Tabelle 2: Chemische Verschiebung und Multiplizität der abweichenden Signale

Ohchinolid A	Ohchinolid B
128.64 d	12.09 q
129.16 d	14.46 q
130.44 s	128.61 s
133.41 s	137.19 d
164.45 s	165.99 s

Durch den Vergleich mit den ^{13}C-NMR-Daten des Ohchinal[27], das an C-1 eine Benzoyloxygruppe besitzt, konnten deren Signale beim Ohchinolid A zugeordnet werden und durch Vergleich mit dem ^{13}C-NMR-Spektrum des Salannin[44] die Signale

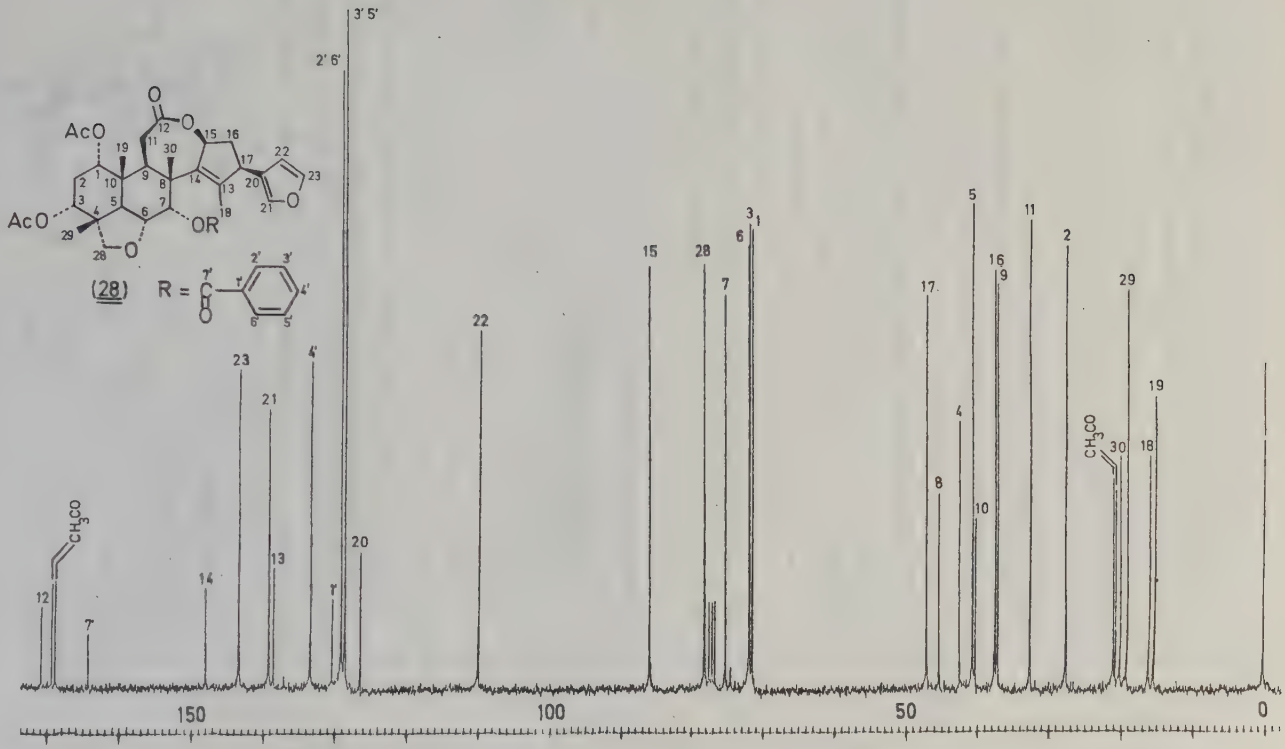


Abb. 4: ^{13}C-NMR von Ohchinolid A (28), (75.46 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

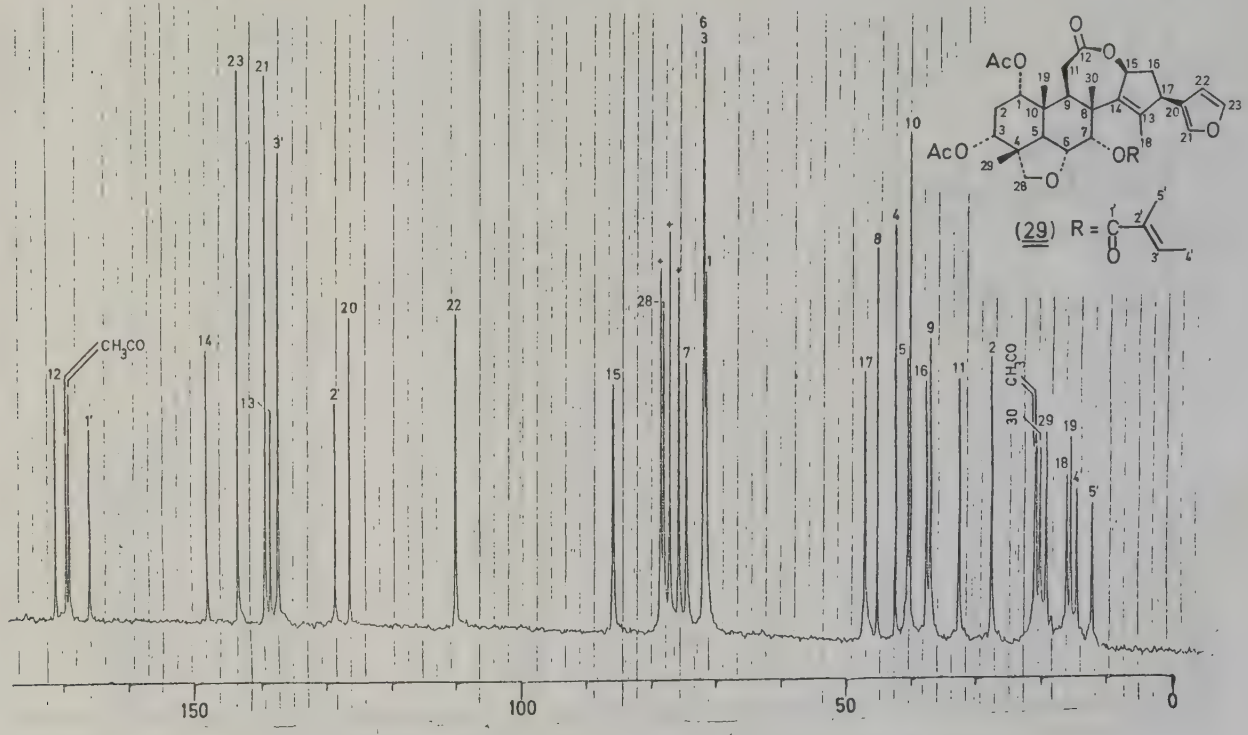


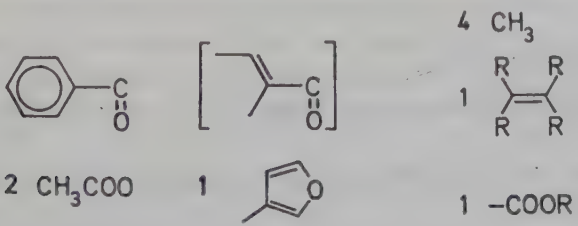
Abb. 5: ^{13}C-NMR von Ohchinolid B (29), (22.63 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

der Tigloyloxygruppe beim Ohchinolid B. Beide Substanzen unterscheiden sich also nur in einer Esterfunktion. Damit stimmt auch die Massendifferenz von 22 überein. Durch die sich aus der Rotation um die C_2 - Achse ergebende magnetische Äquivalenz je zweier Kohlenstoffatome konnte nun auch erklärt werden, daß das Spektrum des Ohchinolid A nur 35 Linien statt der nach der Summenformel zu erwartenden 37 aufwies.

Außer dem durch Konjugation zum Phenylrest bzw. der Doppelbindung der Tiglinsäure tieffeldverschobenen Estercarbonylsignal sind noch drei weitere im Molekül vorhanden. Entsprechende Absorptionen im Methylbereich ließen zwei Acetylgruppen vermuten.

Abgesehen von den Signalen der ungesättigten Säurereste befinden sich im olefinischen Bereich von δ110.00 bis δ148.05 noch sechs weitere Signale, von denen drei im Off-Resonance-Spektrum Singuletts und die übrigen drei Dubletts bilden. Letzere und ein Singulett sind einem Furanring zuzuordnen. Von den sechs Signalen des olefinischen Bereiches bleiben somit zwei Singuletts übrig. Das Molekül muß also eine tetrasubstituierte Doppelbindung besitzen.

Sechs Signale von C-Atomen, die sich in Nachbarschaft zu Sauerstoffen befinden, liegen bei δ85.84 - 74.46. Gut abgesetzt von den Methylengruppensignalen sind sechs (beim Ohchinolid B acht) Signale von Methylgruppen zu finden, von denen zwei den Acetoxygruppen zugeordnet wurden. Damit können folgende Strukturelemente genannt werden:



5.2.3 Die 300 MHz ^{1}H-NMR-Spektren

Die 300 MHz ^{1}H-NMR-Spektren (Abb. 6 und 7, Tabelle 7)[45] zeigen ebenfalls, daß beide Substanzen das gleiche Grundgerüst besitzen. In den Protonenspektren der Ohchinolide weichen die chemischen Verschiebungen besonders der Protonen, die sich im Bereich der Anisotropie des Phenylrestes befinden, stark voneinander ab. Spinsysteme, die z.B. beim Ohchinolid A teilweise verdeckt sind, liegen beim Ohchinolid B völlig frei und können so leichter analysiert werden und umgekehrt. In der folgenden Interpretation werden bei der Angabe von chemischen Verschiebungen im Text die Werte des Ohchinolid B jeweils in Klammern hinter denen des Ohchinolid A aufgeführt.

Die Spektren der Ohchinolide zeigen 3 anguläre Methylgruppen bei δ1.10 (1.06), 1.22 (1.20) und δ1.53 (1.48) s, je 3H und eine vinylische Methylgruppe bei δ1.89 (1.84), s, 3H. Leicht können auch die Signale zweier Acetoxygruppen δ1.98 (2.02) und δ2.24 (2.12), s, je 3H, eines Benzoesäureesters (Ohchinolid A), δ7.46, 8.12, m, je 2H und 7.62, m, 1H, bzw. eines Tiglinsäureesters (Ohchinolid B), δ6.95 (1H, qq, J = 7.2 und 1 Hz), 1.84 (3H, dq, J = 7.2 und 1 Hz), 1.92 (3H, dq, J = 1 Hz) zugeordnet werden. Ebenso die Furanprotonen bei δ7.30 (7.32), 6.29 (6.32) und 7.24 (7.27), m, je 1H.

Nach dem PND-^{13}C-NMR-Spektrum sind jedoch vier Carbonylgruppen vorhanden, von denen nur drei mit entsprechenden Säureresten im Protonenspektrum in Verbindung gebracht werden können. Eine Aldehydfunktion ist ebenfalls laut Protonenspektrum nicht vorhanden. Das läßt einen "intramolekularen" Ester, also ein Lacton vermuten. Die relativ zu den anderen Carbonylgruppen bei tieferem Feld auftretende Carbonylabsorption δ171.09 (171.22) deutet darauf hin.

Unter Berücksichtigung aller sauerstofftragenden funk-

(28) R = C(=O)–C6H5

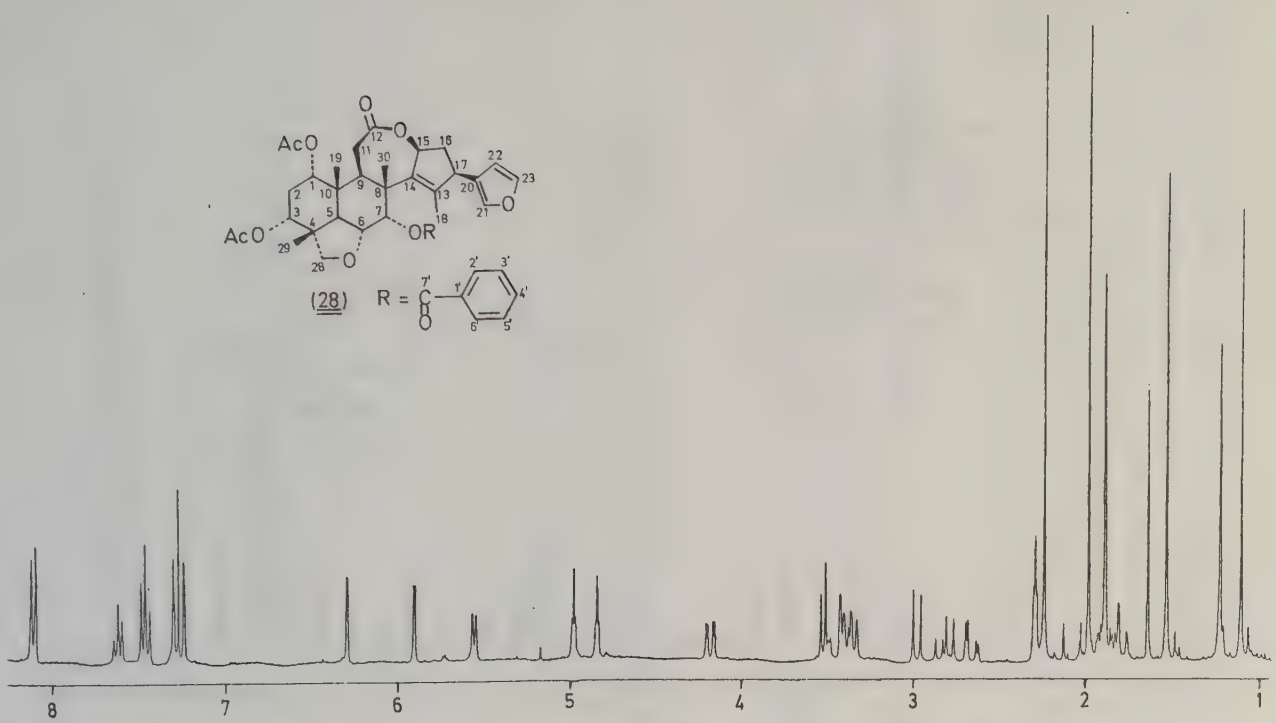


Abb. 6: ^{1}H-NMR von Ohchinolid A (28), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

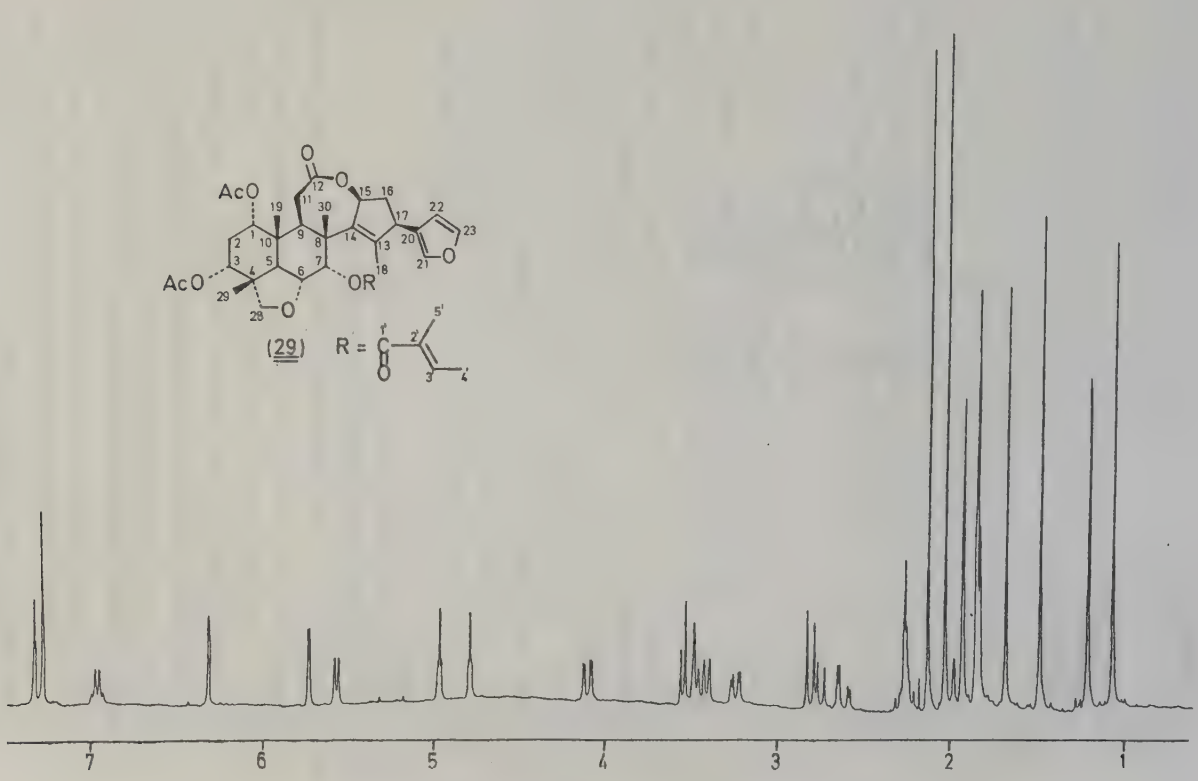


Abb. 7: ^{1}H-NMR von Ohchinolid B (29), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

tionellen Gruppen bleibt von den 10 Sauerstoffatomem der Summenformel eines nicht zugeordnet. Das intakte Meliacansystem besitzt fünf Methylgruppen. Sowohl im ^{13}C-NMR-Spektrum, wie auch im Protonenspektrum wurden jedoch bei den Ohchinoliden nur vier Methylgruppensignale gefunden. Es scheint also eine Methylgruppe des Meliacansystems zur Oxomethylengruppe aufoxidiert worden zu sein. Damit wäre auch der letzte Sauerstoff einem Strukturelement zugeordnet.

5.2.4 Die IR-Spektren der Ohchinolide

In den IR-Spektren der Ohchinolide lassen sich alle bereits gefundenen funktionellen Gruppen ebenfalls nachweisen: 3190 (3080), 880 (875) Furan, 1740, 1720 (1730, 1740) Estercarbonyl, 1260, 1055, 1030 (1280, 1255, 1050, 1020) cm^{-1} C-O.

5.2.5 Die Konstitution und Konfiguration der Ringe A und B

Die bisher beschriebenen spektroskopischen Daten lassen vermuten, daß die Ohchinolide dieselbe Konstitution und Konfiguration der Ringe A und B besitzen, wie beispielsweise das Salannin[46] oder die Nimboline A und B[25] (Abb. 8).

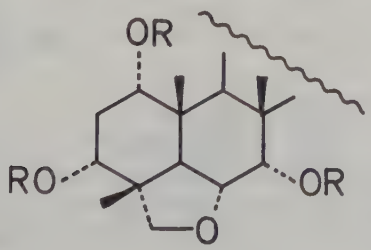


Abb. 8: Struktur der Ringe A und B der Nimboline A und B.

Dies kann durch die Analyse folgender Spinsysteme bewiesen werden:

- des A_2XY-Systems 1-H, 2-Hα,β 3-H
- des ABX-Systems 5-H, 6-H, 7-H
- des AB-Systems 28-Hα,β

Die Signale der beiden den X bzw. Y Teil des A_2XY-Systems bildenden Protonen sind wegen der am selben Kohlenstoff befindlichen Estergruppen bei tiefem Feld zu finden [δ 4.84 (4.79) und δ 4.98 (4.96)]. Beide bilden ein Triplett mit der Kopplungskonstante ^3J = 3 Hz. Einstrahlen auf diese Signale führt jedesmal nur zur Vereinfachung des Tripletts bei δ 2.29 (2.26) zu einem Dublett mit der Kopplungskonstanten ^3J = 3 Hz. Dies der Integration nach 2 Protonen entsprechende Signal ist somit 2-Hα und 2-Hβ zuzuordnen (Abb. 9a und 9b).

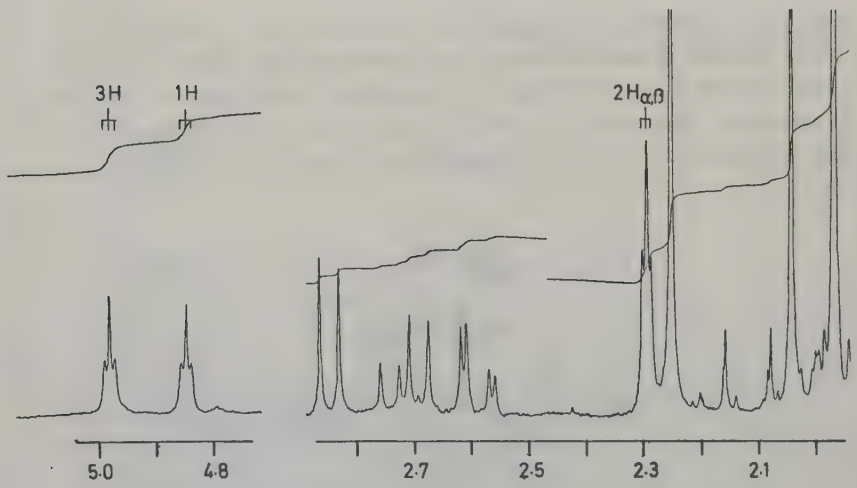


Abb. 9a: A_2XY-System 1-H, 2-Hα,β, 3-H des Ohchinolid A.

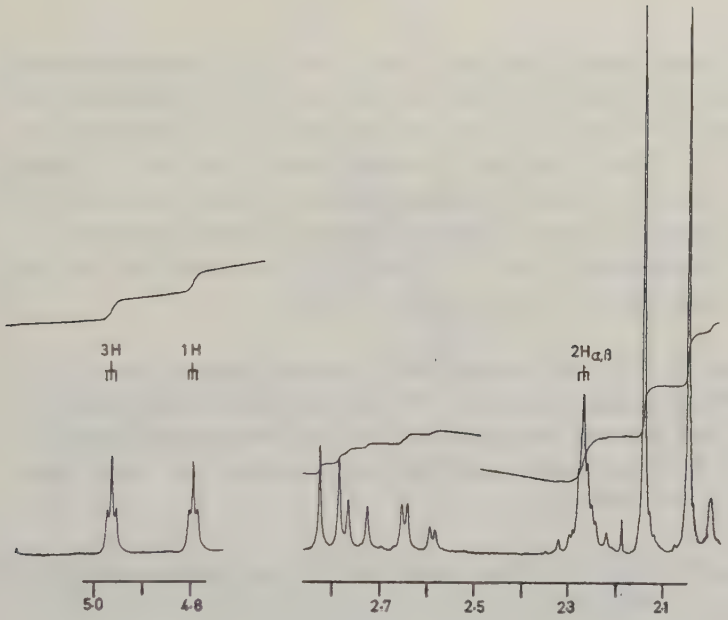


Abb. 9b: A_2XY-System 1-H, 2-Hα,β, 3-H des Ohchinolid B.

Das Kopplungsmuster von 1-H und 3-H und die Ergebnisse der Entkopplungsexperimente sind nur erklärlich, wenn beide Protonen in äquatorialer 1,3-Position stehen und die Winkelhalbierende von 2-Hα und 2-Hβ bilden. Beide Sauerstofffunktionen stehen demnach axial.

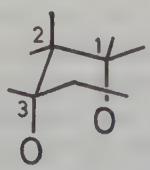


Abb. 10: Teilstruktur C-1, C-2 und C-3 des Ringes A.

Interessanterweise sind hier 2-Hα und 2-Hβ magnetisch äquivalent.

Die trans-Verknüpfung der Ringe A und B im Meliacangerüst mit β-axial ständiger Methylgruppe an C-10 lassen für 5-H nur eine α-axiale Stellung zu. Die große Kopplungskonstante 12.7 Hz zeigt, daß 6-H β-axial, also trans zu 5-H steht. Der an C-6 befindliche Ethersauerstoff bedingt die Tieffeldverschiebung von 6-H, δ4.18 (4.10). 6-H und 7-H stehen axial, äquatorial, also cis zueinander, wie aus der kleinen Kopplungskonstante von 3 Hz hervorgeht.

Auffällig ist die starke Tieffeldverschiebung von 7-H. Ein Vergleich mit Salannin und Nimbolin A in Tabelle 3 zeigt, daß bei den Ohchinoliden keine Etherbrücke zwischen C-7 und C-15 vorliegt, sondern ein Säurerest mit dem Sauerstoff an C-7 verestert ist.

Tabelle 3: Vergleich der chemischen Verschiebung von Salannin, Nimbolin A und der Ohchinolide. δ(ppm)

	Salannin	Nimbolin A	Ohchinolide
7-H	4.18	5.65	5.90 (5.72)

In Abbildung 11 ist das Strukturelement C-5, C-6 und C-7 gezeigt mit dem zugehörigen AMX-Spektrum.

Vollendet wird der C-4 und C-6 verbindende Fünfringether durch die aus der Methylgruppe 28-H des Meliacansystems entstandene Oxomethylengruppe. Die Protonen an C-28 bilden ein AB-System mit einer geminalen Kopplung von ^2J = 7.7 Hz. Der B-Teil ist durch long-range-Kopplung zur Methylgruppe 29-H verbreitert, wie durch den Intensitätszuwachs dieser Methylgruppe beim Einstrahlen auf den B-Teil bewiesen werden kann.

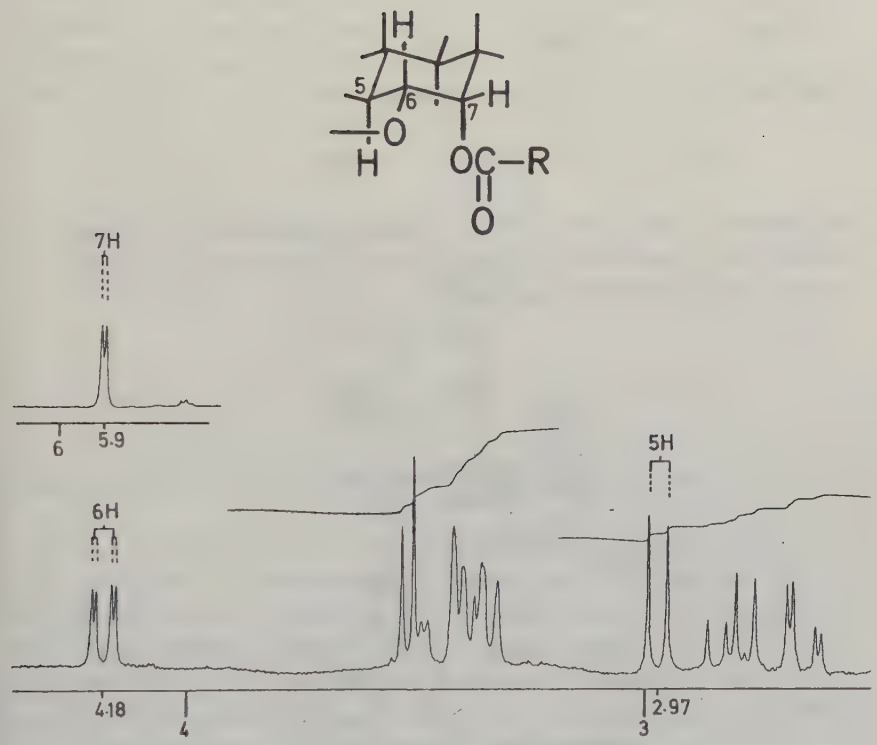


Abb. 11: AMX-Spektrum 5-H, 6-H,7-H und zugehöriges Strukturelement.

Es bleibt noch die Verteilung der drei Säurereste auf die Sauerstoffunktionen an C-1, C-3 und C-7. Eine Gegenüberstellung der chemischen Verschiebungen der den Esterfunktionen benachbarten Protonen 1-H, 3-H und 7-H der beiden Ohchinolide zeigt, daß 7-H die größte Abweichung besitzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Gegenüberstellung der chemischen Verschiebungen der Protonen 1-H, 3-H und 7-H der beiden Ohchinolide. δ(ppm)

	1-H	3-H	7-H
Ohchinolid A	4.84	4.98	5.90
B	4.79	4.96	5.72
Δ	0.05	0.02	0.18

Das beweist, daß hier die Benzoyloxy- (Ohchinolid A) bzw. Tigloyloxygruppe lokalisiert sein muß. Damit ist die Struktur der Ringe A und B bewiesen.

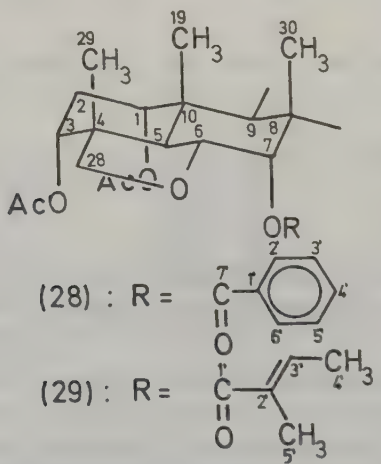


Abb. 12: Die Ringe A und B der Ohchinolide.

5.2.6 Die Konstitution und Konfiguration der Ringe C und D

Bei der groben Zuordnung der ^{13}C-Signale in Kap. 5.2.2 konnten zwei Singuletts im Bereich der olefinischen Protonen (δ110.00 - δ148.05) weder einem β-substituierten Furanring, noch quartären C-Atomen der Benzoyloxy- bzw. Tig-

loyloxygruppe zugeordnet werden. Daraus wurde geschlossen, daß im Molekül eine tetrasubstituierte Doppelbindung vorhanden sein muß, die sinnvoll nur im Ring D untergebracht werden kann. Dann scheiden aber Strukturen, wie z.B. das Vilasinin[47] oder Nimbolinin A[25] aus, da hier eine Δ-14 Doppelbindung vorliegt mit Wasserstoff an C-15 (Abb. 13).

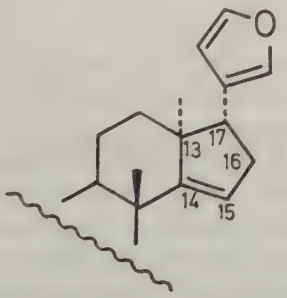


Abb. 13: Die Ringe C und D beim Vilasinin und Nimbolin A.

Durch Korrelation aller Signale von Estercarbonylgruppen im ^{13}C-NMR mit entsprechenden Signalen von Säureresten im Protonenspektrum konnte auf ein Lacton geschlossen werden. Dies kann sowohl im Ring D, als auch im Ring C eingebaut werden. Aus der Literatur sind zahlreiche Beispiele bekannt, bei denen der Ring D zum δ-Lacton aufoxidiert ist[48]. In keinem Fall aber befindet sich gleichzeitig eine tetrasubstituierte Doppelbindung im Ring D.

Dieser könnte jedoch eine Struktur besitzen, wie es auch beim Salannin und Nimbin beispielsweise der Fall ist. Denn hier ist die Doppelbindung von Δ-14 zu Δ-13 verschoben, verbindet also zwei quartäre Kohlenstoffatome (Abb. 14). Sowohl Nimbin, wie auch Salannin besitzen aber ein Siebenspinsystem im ^{1}H-NMR-Spektrum, das sowohl die Protonen des 5-Ringes, also 15-H, 16-H$_{\alpha u.\beta}$ und 17-H, wie auch die Methylgruppe 18-H einschließt, die homoallylisch mit 15-H gekoppelt ist. Ein solches Spinsystem wurde nicht gefunden.

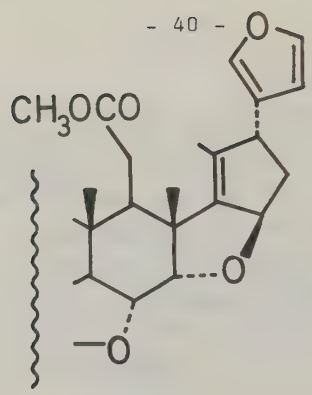


Abb. 14: Ring D beim Salannin und Nimbin.

Statt dessen fallen im Protonenspektrum zwei breite Dubletts auf. Eines, dessen Tieffeldverschiebung auf einen unmittelbar benachbarten Sauerstoff hindeutet, bei δ5.55 (5.57), ^3J = 9 Hz und das andere bei δ3.34 (3.41), ^3J = 9 Hz. Die Kopplungspartner der beiden Signale konnten nur beim Ohchinolid B eindeutig gefunden werden. Die betreffenden Signale sind beim Ohchinolid A vermutlich durch die Anisotropie der Benzoyloxygruppe an C-7 stark hochfeldverschoben und werden von den Methylgruppensignalen verdeckt.
Die Zuordnung des gesamten Spinsystems gelang beim Ohchinolid B durch folgende Entkopplungsexperimente:

1.) Einstrahlen auf das Dublett bei δ5.57:

Das Multiplett bei δ2.20 - 2.32, das unter dem Signal von 2-H$_{\alpha u. \beta}$ liegt, wird zu einem Dublett von Dubletts mit der Kopplungskonstante ^2J = 15 Hz und ^3J = 9 Hz. Das Signal bei δ1.96 zeigt eine gerade noch aufgelöste Feinkopplung von ca. 0.5 Hz.

2.) Einstrahlen auf das Dublett bei δ3.41:

Wiederum wird aus dem Multiplett ein Dublett von Dubletts, diesmal aber mit den Kopplungskonstanten ^3J = 7.0 und ^2J = 15 Hz. Das Signal bei δ1.96 wird schlanker.

3.) Einstrahlen auf das Multiplett bei δ2.20 - 2.31 ppm:

Beide Dubletts δ5.57 und 2.41 werden zu Singuletts, außerdem verschwindet das Signal bei δ1.96 und es taucht ein neues bei δ1.94 ppm auf.

4.) Einstrahlen auf δ1.94 ppm:

Es verschwindet die geminale Kopplungskonstante des Multipletts von ^2J = 15 Hz. Leider wird das Signal nun so schmal, daß es von 2-Hα,β überlagert wird und nur noch der linke und der rechte Ast des entstehenden Dubletts von Dubletts gesehen werden kann. Abbildung 15 zeigt das gesamte Spinsystem und ein simuliertes Spektrum[50].

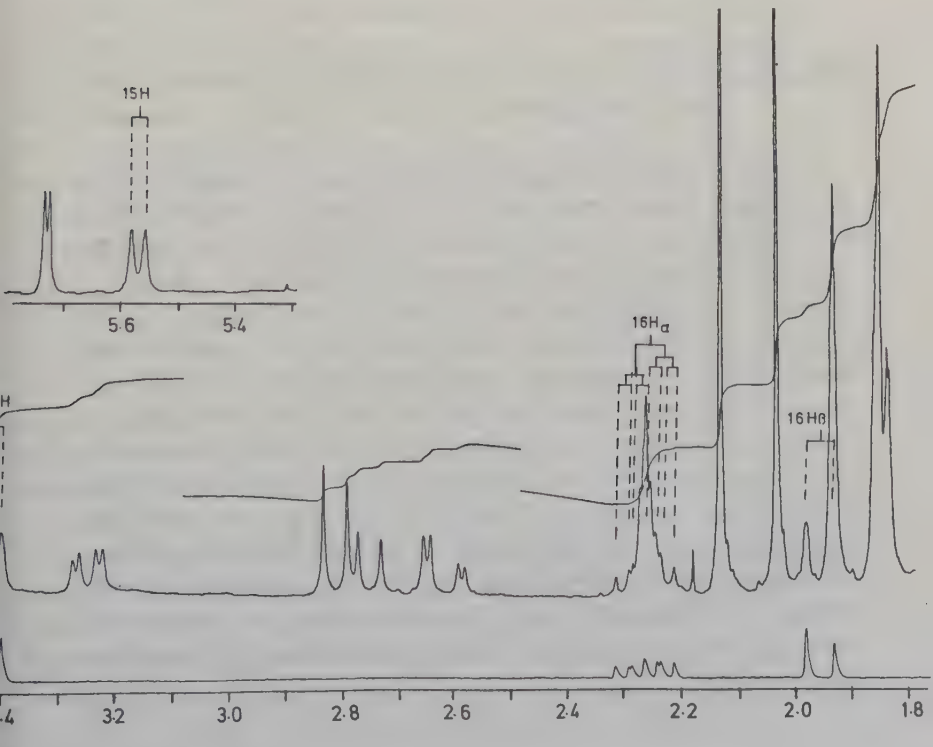


Abb. 15: AMXY-System 15-H, 16-Hα,β 17-H von Ohchinolid B.

Die Ergebnisse sind mit zwei Strukturvorschlägen zu vereinbaren:

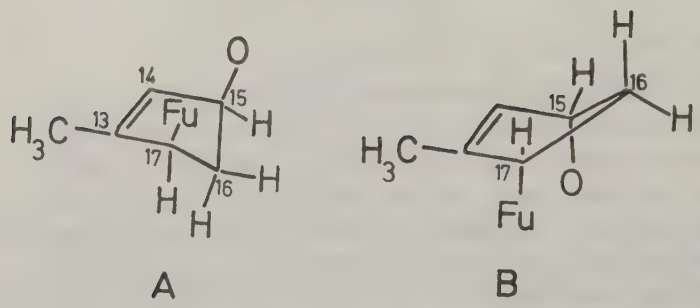


Abb. 16: Nach den Entkopplungsexperimenten mögliche Strukturen des Ringes D.

In beiden Fällen sind also Furanring und Sauerstoffatom pseudoaxial angeordnet. In A und B liegt ein Winkel von 90° zwischen 17-H, 16-Hβ und 15-H (A) bzw. 17-H, 16-Hα 15-H (B) vor, was eine vicinale Kopplung von ca. 0 Hz zwischen 17-H, 16-Hβ, 15-H (A) bzw. 17-H, 16-Hα 15-H (B) bedingt. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß bei den Ohchinoliden im Gegensatz beispielsweise zum Salannin weder eine Homoallylkopplung von 18-H zu 15-H, noch von 17-H zu 15-H beobachtet wurde. Bei den C-seco-Verbindungen vom Salannintyp ist der D-Ring durch den stark gespannten 5-Ring-Ether zwischen C-7 und C-15 in einer Konformation fixiert, wie sie in Abbildung 17 B wiedergegeben wird. 15-H, das hier trans-ständig zu 17-H ist, schließt einen Winkel von nahezu 180° mit den p-Orbitalen der Doppelbindung ein und bietet somit ideale Bedingungen für eine Homoallylkopplung[51].

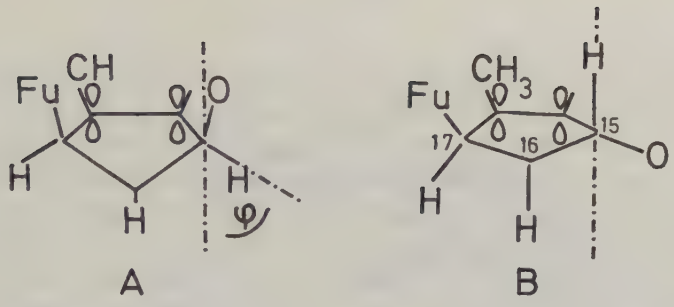


Abb. 17: Konfiguration des Ringes D bei den Ohchinoliden (A) und beim Salannin (B).

Anders bei den Ohchinoliden. Die hier vorhandene größere Flexibilität des 5-Ringes begünstigt eine Konformation, bei der 15-H und 17-H, die pseudoäquatorial-1,3-ständig sind, möglichst weit vom pseudoaxial, also cis stehenden Proton an C-16 entfernt sind. Sie schließen einen für die Homoallylkopplung ungünstigen Winkel von $\varphi \approx 60^{\circ}$ mit den p-Orbitalen der Doppelbindung ein. Die Entscheidung zwischen den in Abbildung 16 gezeigten Möglichkeiten konnte durch die Messung des Nuclear Overhauser Effects (NOE) getroffen werden. Wird die Methylgruppe 30-H gesättigt, so erfährt neben den Protonen 7-H und 6-H auch das Proton 22-H am Furanring einen NOE. Der Furanring muß also β-ständig sein, d.h. es liegt Struktur A vor. Die β-Konfiguration der Sauerstofffunktion an C-15 und des Furanrings an C-17, die von Ochi[40] durch Röntgenstrukturanalyse für das Ohchinolid A (28) bestimmt wurde, ist damit durch die NOE-Messung auch für das Ohchinolid B bewiesen. Das Multiplett (ddd) bei δ2.20 - 2.32 wäre dann 16-Hα und das Dublett bei δ1.94 16-Hβ zuzuordnen. Damit ist dies Strukturelement vollständig abgesichert. Das Lacton kann nun nur noch im Ring C eingebaut werden. Aus der Literatur[52] ist bekannt, daß die dem Lactonsauerstoff benachbarten Protonen in gesättigten ε-Lactonringen eine ähnliche chemische Verschiebung besitzen wie 15-H. Der Lactonring besitzt also die in Abbildung 18 gezeigte Konstitution.

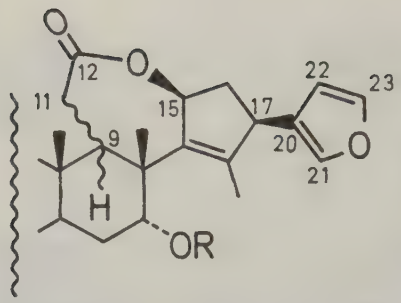


Abb. 18: Konstitution des Lactonrings.

Seine Konfiguration an C-9 kann durch Analyse des ABX-Systems 9-H, 11-Hα,β bestimmt werden.

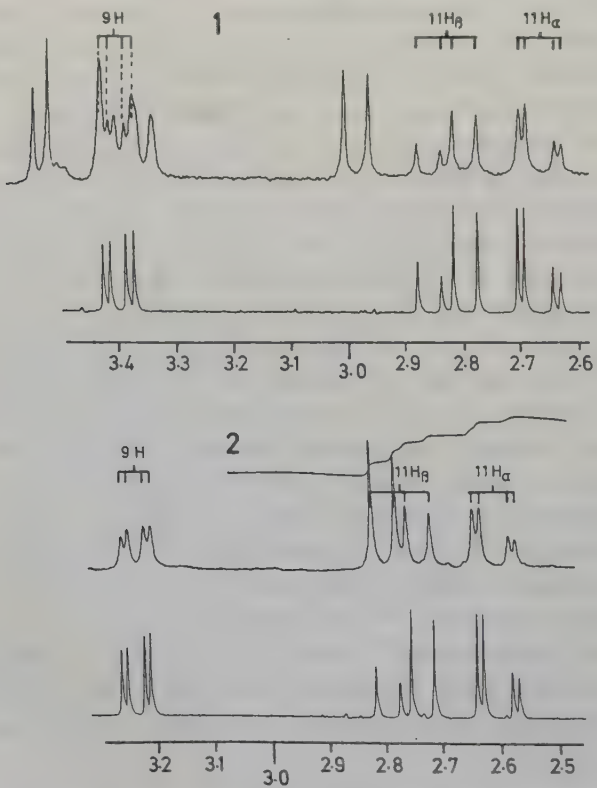


Abb. 19: ABX-System 9-H, 11-Hα,β der Ohchinolide A (1) und B (2).

Der X-Teil ist beim Ohchinolid A stark tieffeldverschoben und wird durch das Signal von 17-H und dem AB-System 28-Hα,β verdeckt. Die aus den Spektren entnommenen Frequenzen der einzelnen Übergänge des AB-Teils wurden zur Berechnung der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten in die der Literatur[53] zu entnehmenden Formeln zur Berechnung von ABX-Spektren eingesetzt. Die Rechnung ergab zwei Lösungen, von denen die eine zu hohe vicinale Kopplungskonstanten aufwies und deshalb ausschied. Zur Wahl der relativen Vorzeichen der Kopplungskonstanten wurden die berechneten Werte in den Computer eingegeben und ein Spektrum simuliert (Abb. 19). Die Übereinstimmung der Linienintensität des experimentellen und des gerechneten Spektrums zeigt, daß die relativen Vorzeichen der Kopplungskonstanten korrekt sind.

Tabelle 5: Berechnete Daten des ABX-Systems 9-H und 11-Hα,β der Ohchinolide A und B.

	9-H		11-Hα		11-Hβ	
	ppm	J Hz	ppm	J Hz	ppm	J Hz
Ohchinolid A	3.40		2.66		2.80	
		12.7				12.7
		3.5		3.5		
				18		18
Ohchinolid B	3.24		2.61		2.76	
		12.8				12.8
		3		3		
				18		18

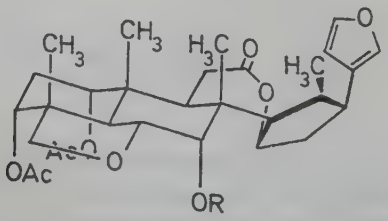
Die beiden vicinalen Kopplungskonstanten zeigen, daß 9-H und 11-Hβ jeweils axial bzw. 9-H axial und 11-Hα äquatorial stehen müssen. Damit ist die Konfiguration des Lactons festgelegt. Informationen über die Konformation liefert die ge-

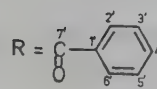
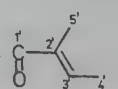
minale Kopplungskonstante von 11-H$_{\alpha u.\beta}$ deren Größe durch die Lage der p-Orbitale der benachbarten Carbonylgruppe beeinflußt wird. Läge eine Sesselkonformation vor, so wären die Protonen 11-H$_{\alpha u.\beta}$ wie in Abbildung 20a gezeigt angeordnet[54].

a b

Abb. 20: Projektion des p-Orbitals der Carbonylgruppe an C-12 auf 11-H$_{\alpha u.\beta}$

Es wäre eine geminale Kopplungskonstante von ^2J = 12 bis 14 Hz zu erwarten. Liegt der Siebenring in einer Wannenkonformation vor, kann am Modell gezeigt werden, daß die sterischen Wechselwirkungen am geringsten sind, wenn die Carbonylgruppe die Winkelhalbierende des Winkels 11-H$_\alpha$, C-11, 11-H$_\beta$ bildet. Das p-Orbital ist dann wie in Abb. 20b gezeigt angeordnet, und es ist eine geminale Kopplungskonstante von ^2J = 16 - 18 Hz zu erwarten. Gefunden wurde ^2J = 18 Hz. Damit ist die Konformation des Lactonrings bestimmt und den Ohchinoliden kommt die Struktur (28) bzw. (29) zu.



(28) R =  (29) R = 

5.2.7 NOE-Messungen am Ohchinolid B und Zuordnung der Methylgruppen[55)56)]

Der Nuclear Overhauser Effect (NOE) ist am bekanntesten aus der ^{13}C-NMR-Spektroskopie, wo er eine beträchtliche Verbesserung der Empfindlichkeit bei der Aufnahme entkoppelter Spektren bewirkt. Im Prinzip beruht er darauf, daß bei Sättigung eines Spins durch ein starkes mit seiner Larmorfrequenz übereinstimmendes elektromagnetisches Feld die Gleichgewichtspopulation hauptsächlich durch Dipol-Dipolwechselwirkung mit räumlich benachbarten Kernen wiederhergestellt wird. Dieser Energietransfer, der gemäß der Wechselwirkungsenergie von Dipolen in Lösung dem Faktor $1/r^6$ proportional ist, führt zu Spin-Gitter-Relaxation der benachbarten Kerne. Dadurch wird die Population der energieärmeren Niveaus dieser Kerne erhöht und als Folge davon auch die Signalintensität. Wegen des starken Abfalls der Wechselwirkungsenergie mit zunehmendem Abstand vom gesättigten Kern ist hier eine leistungsfähige Methode zur Aufklärung der Stereochemie von Molekülen gegeben.

Die Effekte bei NOE-Experimenten in der Protonenresonanzspektroskopie sind in der Regel sehr klein. Deshalb muß die Probe zur Entfernung des paramagnetischen, die Relaxation beschleunigenden Sauerstoffes entgast werden.

Es hat sich bewährt, sogenannte NOE-Differenzspektren aufzunehmen. Bei dieser Methode werden beispielsweise 20 Scans aufgenommen, bei denen der f_2-Sender auf irgendeine Stelle außerhalb des Spektrums einstrahlt. Anschließend werden 20 Scans akkumuliert, bei denen er auf das gewünschte Signal im Spektrum einstrahlt. Der FID (Free Induction Decay) wird um 180° gedreht und vom ersten abgezogen. Auf diese Weise verschwinden alle Signale, die keinen Intensitätszuwachs erfahren. Dieser Zyklus kann beliebig oft durchlaufen werden. Nach Beendigung der Messung wird der FID noch einmal um 180° gedreht und fouriertransformiert. Alle Signale, die einen positiven NOE erfahren, stehen aufrecht, während das

eingestrahlte Signal negativ ist.

Beim Ohchinolid B wurden alle 4 Methylgruppen gesättigt und folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 6: NOE-Experimente (s = stark, m = mittel, w = schwach).

eingestrahltes Signal	gefundene Signale
1.84 (18-H und 4'-H)	3.41 (17-H) w, 5.72 (7-H) s, 6.32 (22-H) m, 7.27 (23-H) m, 6.95 (3'-H) w
1.06 (19-H)	4.79 (1-H) s, 4.96 (3-H) m, 2.26 (2-Hβ) m, 2.76 (11-Hβ) w, 4.10 (6-H) s
1.20 (29-H)	3.54 (28-Hβ) w, 2.26 (2-Hβ) w, 4.10 (6-H) s, 4.96 (3-H) s, 4.79 (1-H) w
1.48 (30-H)	4.10 (6-H) s, 5.72 (7-H) s, 6.32 (22-H) w

Damit sind die Methylgruppen, 28-Hβ, 11-Hβ, 1-H und 3-H eindeutig zugeordnet. Die ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Spektren von (28) und (29) (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm, bezogen auf TMS = 0; Kopplungskonstanten in Hz.

	(28)	(29)
1-H	4.84 (1H,t,J=3)	4.79 (1H,t,J=3)
2-Hα 2-Hβ	2.29 (2H,t,J=3)	2.26 (2H,t,J=3)
3-H	4.98 (1H,t,J=3)	4.96 (1H,t,J=3)
5-H	2.97 (1H,d,J=12.7)	2.81 (1H,d,J=12.7)

	(28)	(29)
6-H	4.18 (1H,dd,J=12.7 u.2.7)	4.10 (1H,dd,J=12.7 u.2.7)
7-H	5.9 (1H,d,J=2.7)	5.72 (1H,d,J=2.7)
9-H	3.4 (1H,dd,J=12.7 u.3.5)	3.24 (1H,dd,J=3 u. 12.8)
11-Hα	2.66 (1H,dd,J=18 u. 3.5)	2.61 (1H,dd,J=18 u. 3)
11-Hβ	2.80 (1H,dd,J=18 u.12.7)	2.76 (1H,dd,J=18 u.12.8)
15-H	5.55 (1H,d,J=6.8)	5.57 (1H,d,J=7.0)
16-Hα	1.78 - 1.86 (2H,m)	2.20 - 2.32 (1H,m)
16-Hβ		1.94 (1H,d,J=15)
17-H	3.34 (1H,d,J=9)	3.41 (1H,d,J=9)
18-H	1.89 (3H,s)	1.84 (3H,s)
19-H	1.10 (3H,s)	1.06 (3H,s)
21-H	7.3 (1H,m)	7.32 (1H,m)
22-H	6.29 (1H,m)	6.32 (1H,m)
23-H	7.24 (1H,m)	7.27 (1H,m)
28-Hα	3.41 (1H,d,J=7.7)	3.47 (1H,d,J=7.6)
28-Hβ	3.52 (1H,d,J=7.7)	3.54 (1H,d,J=7.6)
29-H	1.22 (3H,s)	1.20 (3H,s)
30-H	1.53 (3H,s)	1.48 (3H,s)
CH_3CO	1.98 (3H,s)	2.02 (3H,s)
CH_3CO	2.24 (3H,s)	2.12 (3H,s)
3'-H	-	6.95 (1H,qq,J=7.2 u.1)
4'-H	-	1.84 (1H,dq,J=7.2 u.1)
5'-H	-	1.92 (3H,d,J=1)
Benzoyl-	7.46 (2H,t)	-
oxy	7.62 (1H,t)	-
	8.12 (2H,d)	-

5.2.8 Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale durch Selektiventkopplungen am Ohchinolid B

Nach der vollständigen Zuordnung der ^{1}H-NMR-Spektren war eine Überprüfung der in Kapitel 5.2.2 getroffenen Zuordnung der ^{13}C-Signale durch Selektiventkopplungen möglich. Die Experimente wurden nur am Ohchinolid B durchgeführt. Es wurde an 13 Punkten in das Protonenspektrum eingestrahlt. Da-

bei wurde die Sendeleistung so gewählt, daß die ^{13}C-Satelliten der Protonensignale miterfaßt wurden. Außerdem stand ein gekoppeltes Spektrum von Ohchinolid A zur Verfügung, das nach der Gated-Decoupling-Methode aufgenommen worden war[43].

Beschreibung der einzelnen Entkopplungsexperimente:

- Einstrahlen auf die vier Methylgruppen 19-H (δ1.06), 29-H (δ1.20), 30-H (δ1.48) und 18-H (δ1.84):

  Eine sichere Zuordnung der Methylgruppen ist durch diese Experimente möglich. Beim Einstrahlen auf 18-H werden ausser C-18 auch die Acetylgruppen entkoppelt. Die Methylgruppen der Tiglinsäure sind aufgrund der zusätzlichen Feinaufspaltung von C-4′und C-5′ beim Einstrahlen auf 19-H zuzuordnen.

- Einstrahlen auf 2-Hα,β

  Die Unterscheidung zwischen C-16 und C-2 ist bei diesem Experiment nicht möglich, da beide entkoppelt werden und das Signal von C-16 durch den linken Ast des Dubletts von C-9 überlagert ist.

- Einstrahlen auf 5-H, 11-Hα,β

  C-5 und C-11 wurden entkoppelt, sind aber wegen ihrer Multiplizität leicht zuzuordnen. Das Zusammenbrechen der Long-Range-Kopplung mit dem Carbonylkohlenstoff C-12 führt zu einem starken Intensitätszuwachs dieses Signals.

- Einstrahlen auf 17-H:

  Auch C-9 wird entkoppelt, das Signal ist jedoch weniger intensiv.

- Einstrahlen auf 28-H

  Dieses, die sichere Zuordnung von C-28 ermöglichende Ex-

periment, läßt auch durch Berücksichtigung der Residualkopplungen die Zuordnung von C-1 und C-3 zu, deren Signale eng beieinander liegen.

- Einstrahlen auf 6-H:

  Auch hier können C-1 und C-3 aufgrund ihrer Residualkopplungen unterschieden werden. C-6 kann zweifelsfrei zugeordnet werden.

- Einstrahlen auf 1-H, 3-H, 15-H und 7-H:

  Eine Zuordnung von C-15 und C-7 ist durch diese Experimente zu treffen und durch die im Gated-Decoupled-Spektrum sichtbare Long-Range-Kopplung von C-15 zu 16-H$_{\alpha,\beta}$. C-15 bildet ein Dublett von Tripletts mit den Kopplungskonstanten von 155 und 5 Hz.

- Zuordnung der quartären olefinischen Kohlenstoffatome C-13, C-14 und C-20:

  Eine Unterscheidung der beiden Kohlenstoffe der Doppelbindung ist durch das gekoppelte Spektrum möglich. Das Signal von C-14 besitzt eine aufgelöste Long-Range-Kopplung ^3J = 7 Hz zu den Protonen an C-30, die antiperiplanar zu C-14 orientiert sind. Das Signal von C-13 ist hingegen nur verbreitert. Die ebenfalls im olefinischen Bereich liegenden quartären Kohlenstoffatome C-1'(Benzoyloxygruppe) und C-2'(Tigloyloxygruppe) können durch Spektrenvergleich zugeordnet werden. Damit ist auch C-20 zugeordnet. Die verbleibenden quartären Atome C-4, C-10 und C-8 konnten nur durch Vergleich mit dem Salannin zugeordnet werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: ^{13}C-NMR-Spektren von (28) und (29) (75.46 MHz, $CDCl_3$) δ ppm, bezogen auf TMS = 0.

C-Atom	(28)	(29)
1	71.46 d	71.47 d
2	27.65 t	27.56 t
3	71.83 d	71.80 d
4	42.50 s	42.38 s
5	40.68 d	40.56 d
6	71.99 d	71.80 d
7	75.24 d	75.63 d
8	45.33 s	45.15 s
9	37.19 d	37.02 d
10	40.29 s	40.14 s
11	32.62 t	32.53 t
12	171.09 s	171.22 s
13	138.51 s	138.36 s
14	148.05 s	147.95 s
15	85.84 d	85.90 d
16	37.51 t	37.67 t
17	47.03 d	47.06 d
18	16.08 q	16.02 q
19	15.36 q	15.37 q
20	126.50 s	126.47 s
21	139.21 d	139.21 d
22	110.00 d	110.02 d
23	143.35 d	143.37 d
28	78.17 t	78.04 t
29	19.18 q	19.18 q
30	20.17 q	20.12 q
$H_3\underline{\underline{C}}CO$	21.11 q	21.00 q
$H_3\underline{\underline{C}}CO$	20.83 q	20.12 q
$H_3C\underline{\underline{C}}O$	169.57 s	169.56 s
$H_3C\underline{\underline{C}}O$	169.10 s	169.11 s

C-Atom	(28)	(29)
1′	-	165.99 s
2′	-	128.61 s
3′	-	137.19 d
4′	-	14.46 q
5′	-	12.09 q
1′	130.44 s	-
2′, 6′	129.16 d	-
3′, 5′	128.64 d	-
4′	133.41 d	-
7′	164.45 s	-

5.3 Strukturaufklärung der Nimbolidine

5.3.1 Hochauflösung und Summenformel der Nimbolidine (30) und (31)

Die Summenformeln der Nimbolidine wurden aus den M^+-60-Peaks der hochaufgelösten Massenspektren[41] ermittelt, da die Intensität der M^+-Peaks für die Hochauflösung nicht ausreichte. Für das Nimbolidin A (30) wurde gefunden: M^+-60, $\frac{m}{e}$ = 660.2939, ber.: $\frac{m}{e}$ = 660.2934 und die Summenformel $C_{40}H_{48}O_{12}$, für das Nimbolidin B (31): M^+-60, $\frac{m}{e}$ = 638.3103, ber.: $\frac{m}{e}$ = 638.3090 und die Summenformel $C_{38}H_{50}O_{12}$. Die durch eine Mc-Lafferty-Umlagerung im Massenspektrometer bewirkte Essigsäureabspaltung, die bei den Nimbolidinen zu einem sehr kleinen M^+-Peak führt, ist ein erster Hinweis darauf, daß sie ähnliche Strukturen besitzen. Wie bei den Ohchinoliden unterscheiden sich auch hier die Molekulargewichte um 22 Masseneinheiten.

5.3.2 Bestimmung von Strukturelementen an Hand von IR-, ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten.

Im Unterschied zu den Lactonstrukturen (28) und (29) zeigen die neuen Tetranortriterpenoide (30) und (31) im ^{1}H-NMR-

Spektrum [Tabelle 13, Abb. 21: (30), Abb. 22: (31)] Methoxygruppen-Signale bei δ3.59 (30) bzw. δ3.58 (31) und in den ^{13}C-NMR-Spektren [Tabelle 14, Abb. 23: (30), Abb. 24: (31)] Quartetts bei δ51.99 (30) bzw. δ51.97 (31), sowie Singuletts für C-12 bei δ173.53 (30) bzw. δ173.56 (31). (30) und (31) sind demnach an C-12 wie Salannin[45] funktionalisiert, worauf auch die Hochfeldverschiebung von 11-Hα,β im Vergleich zu (28) und (29) hinweist. Die 11-H-Signale von (30) (δ2.33) und (31) (δ2.25 und 2.3) entsprechen in ihrer chemischen Verschiebung dem 11-H-Signal des Salannins (ca. δ2.22). Auch die angulären, dem Ring C benachbarten Methylgruppen 19-H und 30-H (Tabelle 9) sind zu höherem Feld verschoben.

Tabelle 9: Chemische Verschiebungen der Methylgruppen 30-H und 19-H.

	(28)	(30)	Δ	(29)	(31)	Δ
30-H	1.53	1.30	+0.23	1.48	1.25	+0.23
19-H	1.10	1.20	+0.10	1.06	1.16	+0.10

In den ^{13}C-NMR-Spektren von (30) und (31) sind außer den Signalen der Methoxygruppen je vier weitere Singuletts im Estercarbonylbereich zu beobachten, denen vier Säurereste, und zwar drei Acetylgruppen und ein Benzoesäurerest (30) bzw. drei Acetyl- und ein Tiglinsäurerest (31) im Protonenspektrum entsprechen. Die Stellung zweier Acetoxygruppen an C-1 und C-3 sowie der Benzoyloxy- bzw. Tigloyloxygruppe an C-7 ergibt sich aus der Ähnlichkeit des ABXY-Spektrums von 2-Hαuβ, 1-H und 3-H bzw. des AMX-Spektrums von 5-H, 6-H und 7-H mit den entsprechenden Spinsystemen bei (28) und (29). Daraus folgt, daß der Lactonring von (28) bzw. (29) zum Methylester aufgespalten ist. Da weder im IR- noch im ^{1}H-NMR-Spektrum eine freie OH-Gruppe nachgewiesen werden kann, ist zu schließen, daß die dritte Acetylgruppe mit dem Sauerstoff an C-15 verbunden ist, worauf auch die Tieffeld-

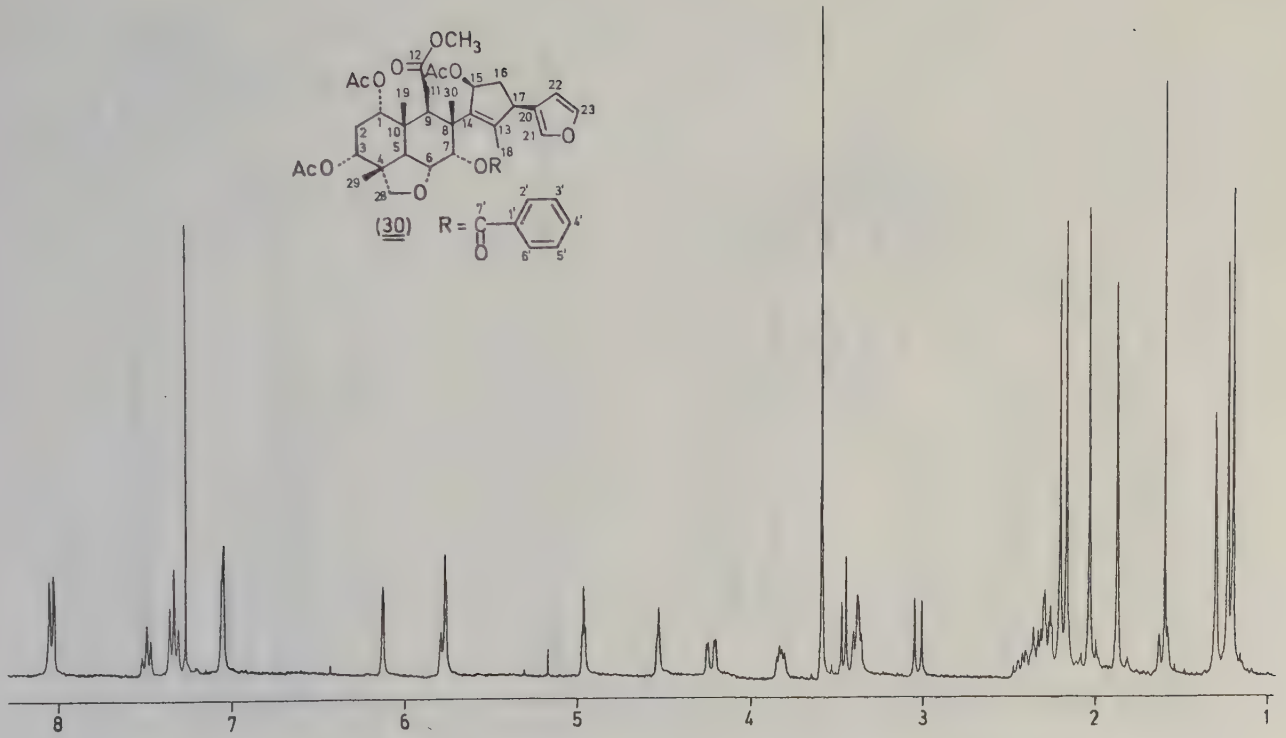


Abb. 21: ^{1}H-NMR von Nimbolidin A (30), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm)

(31) R =

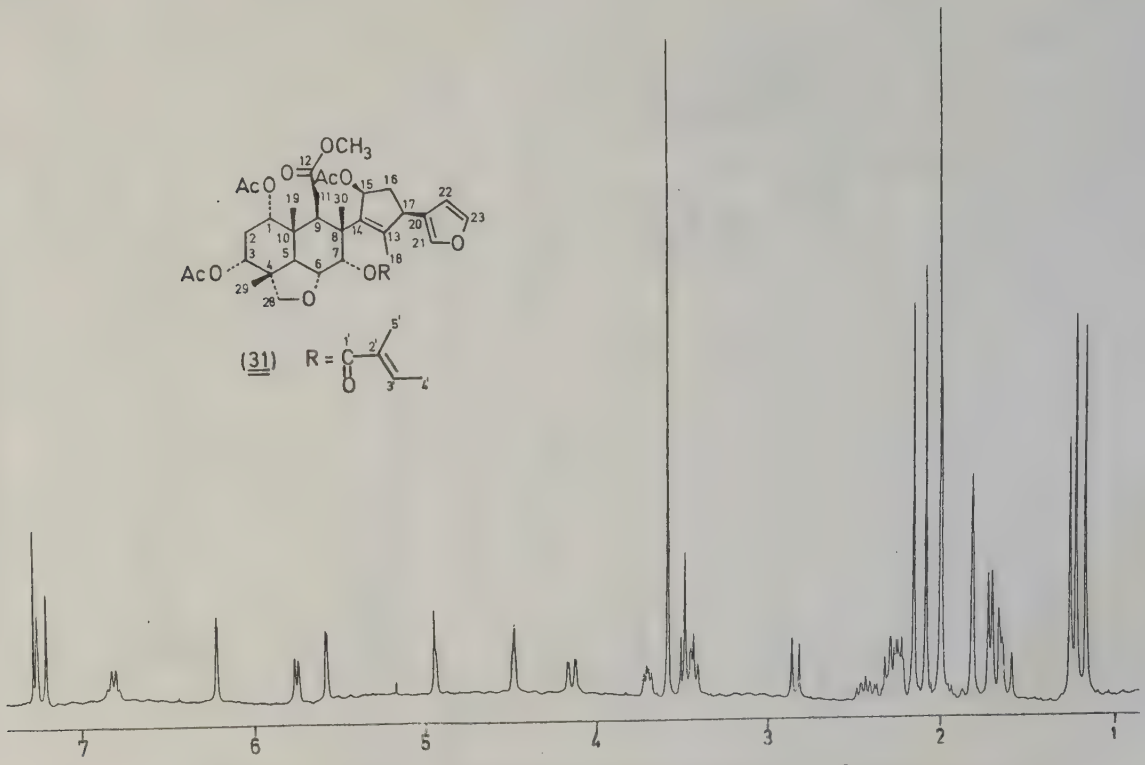


Abb. 22: ^{1}H-NMR von Nimbolidin B (31), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm)

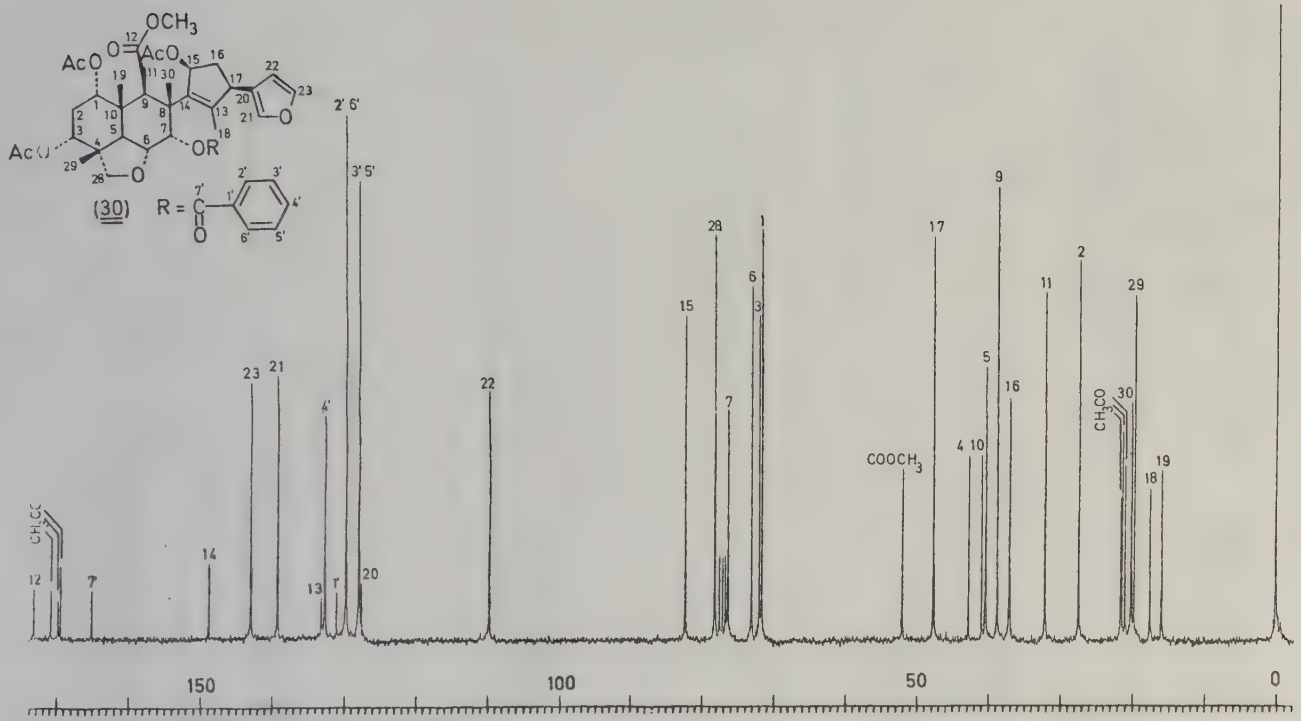


Abb. 23: ^{13}C-NMR von Nimbolidin A (30), (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm)

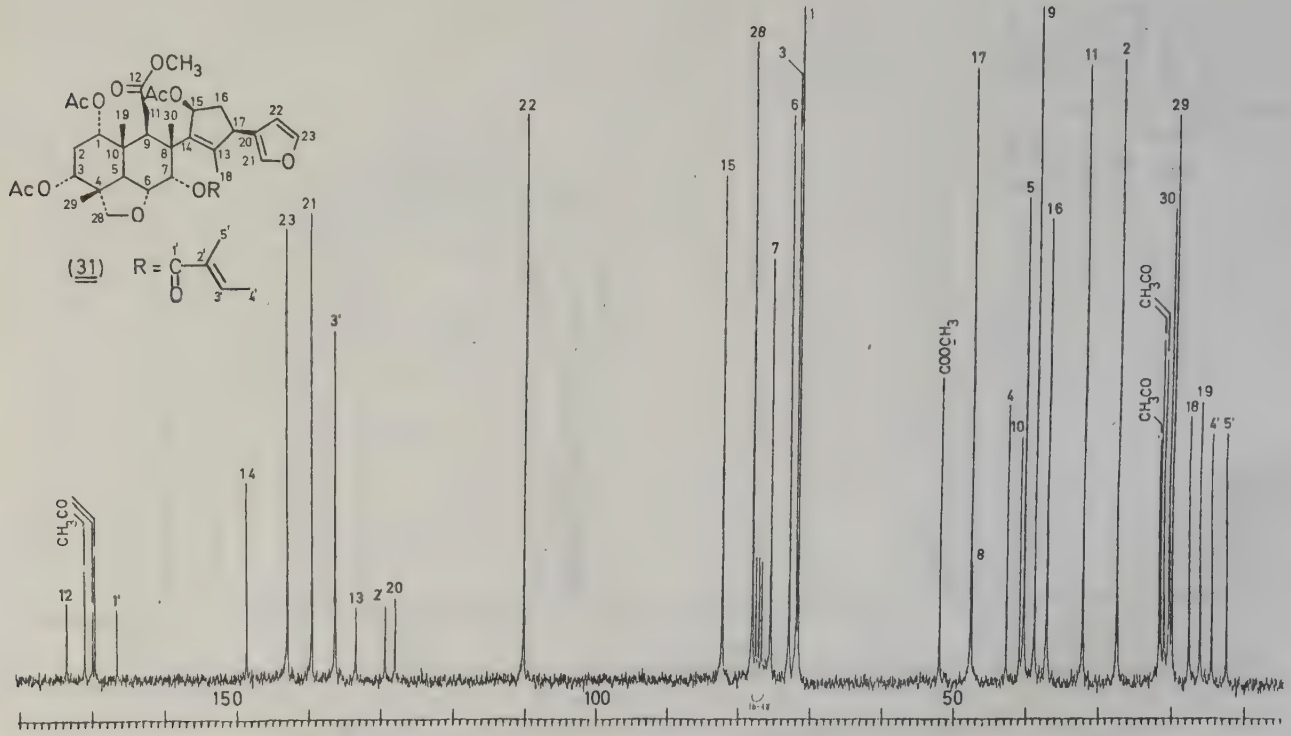


Abb. 24: ^{13}C-NMR von Nimbolidin B (31), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

verschiebung von 15-H gegenüber (28) und (29) hinweist.

5.3.3 Absicherung der Struktur und der ^{1}H-NMR-Zuordnung am Beispiel des Nimbolidin B (31).

Die Analyse des AMX-Systems 5-H (δ2.84, $^3J_{5,6}$ = 12.6 Hz, 6-H (δ4.14, $^3J_{5,6\ u.\ 6,7}$ = 12.6 und 3 Hz) und 7-H (δ5.58, $^3J_{6,7}$ = 3 Hz) bestätigt, daß 5-H und 6-H wie bei den Ohchinoliden (28) und (29) axial, 7-H jedoch äquatorial stehen. Die Tigloyloxygruppe befindet sich also in α-axialer Position.

Schwieriger war die Analyse des von den Protonen an C-1, C-2 und C-3 gebildeten ABXY-Systems. 1-H und 3-H bilden wiederum Tripletts mit der Kopplungskonstanten ^3J = 3 Hz. Wird im Entkopplungsexperiment die Larmorfrequenz von 1-H (δ4.48) eingestrahlt, so sind bei δ2.21 zwei unmittelbar benachbarte Dubletts sichtbar, die beide eine Kopplungskonstante von 3 Hz aufweisen. Das gleiche Ergebnis wird beim Einstrahlen auf 3-H (δ4.94) erzielt. Im Unterschied zu den Ohchinoliden sind hier 2-Hα und 2-Hβ nicht mehr magnetisch äquivalent. Von dem durch die Aufhebung der Kopplung von ^3J = 3 Hz zum X- bzw. Y-Teil entstehenden ABX-System sind jedoch nur die Übergänge f_3, f_4, f_5 und f_6 zu sehen. Sowohl die chemischen Verschiebungen von 2-Hα und 2-Hβ, als auch ihre geminalen Kopplungskonstanten sind daher nicht mehr aus dem Spektrum abzulesen. Deshalb wurden hierfür Werte angenommen und zusammen mit den aus dem Spektrum zu entnehmenden chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten zur Simulation in den Computer eingegeben[50]. Nachdem das berechnete Spektrum dem experimentellen durch Variation der Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen schon sehr ähnlich war, schloß sich eine weitere Verfeinerung durch Iteration an. Hierzu mußten zunächst die Übergänge des experimentellen Spektrums, soweit vorhanden, den berechneten

zugeordnet werden. Die Güte der Übereinstimmung zwischen experimentellem und theoretischem Spektrum wird durch den mittleren quadratischen Fehler (RMS-Wert) ausgedrückt. Der beste erreichbare Wert bei Spektren, die auf Puls-FT-Geräten vermessen werden, ist bestimmt durch den Punktabstand ΔP in Hz pro Datenpunkt[57].

$$RMS_{MIN} = \lim_{N\to\infty} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (v_{i,exp} - v_{i,ber})}{N}} = \frac{1}{6} \times \Delta P \times \sqrt{3}$$

Für eine Spektrenbreite von 3000 Hz, wie sie bei allen von mir gerechnten Spektren vorliegt, und einem Gesamtspeicher von 16 K, also 8 K Realteil, gilt:

$$RMS_{MIN} = 0.11$$

Die Iteration wurde abgebrochen, wenn dieser Wert erreicht war. Für das gerechnete ABXY-System war das der Fall bei einer geminalen Kopplungskonstante von ^2J = 13 Hz und den chemischen Verschiebungen δ 2.19 (2-Hα) und 2.23 (2-Hβ). Abbildung 25 zeigt das gerechnete und das experimentelle Spektrum. Aus den vicinalen Kopplungskonstanten von ^3J = 3 Hz von 1-H und 3-H zu den beiden Protonen an C-2 kann geschlossen werden, daß 1-H und 3-H äquatorial stehen und die Winkelhalbierende von 2-Hα,β bilden. Die beiden Acetoxygruppen sind also wieder α-ständig.

Als nächstes soll das ABX-System 11-H$\alpha_{u.}\beta$, 9-H analysiert werden. Von den 14 theoretisch möglichen Übergängen sind zehn im Spektrum sichtbar. Beim Einstrahlen auf 9-H vereinfacht sich das ABX-System zu einem AB-System, von dem drei Linien sichtbar sind. Das ermöglicht die Bestimmung der geminalen Kopplungskonstante von 11-H$\alpha_{u.}\beta$: ^2J = 14 Hz. Auch die Berechnung der chemischen Verschiebung war damit möglich. Aus dem X-Teil kann noch die Summe der vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{11\text{-H}\alpha,9\text{-H}}$ und $^3J_{11\text{-H}\beta,9\text{-H}}$ entnommen werden. Mit diesen Werten wurde wiederum ein Spektrum simuliert und ite-

riert (Abb. 26).

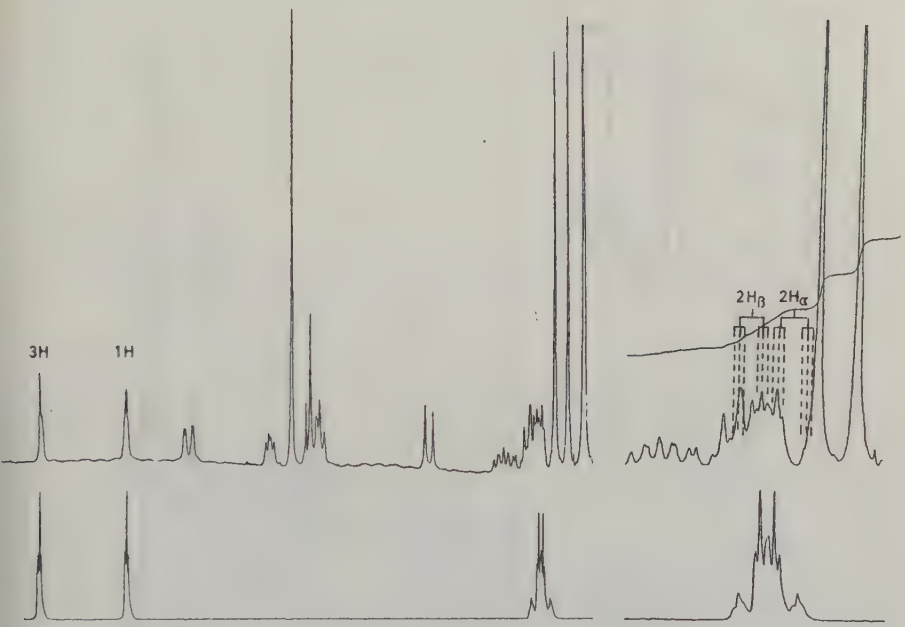


Abb. 25: ABXY-System 1-H, 2-H$\alpha_{\upsilon}.\beta$, 3-H vom Nimbolidin B (31). Die untere Spur zeigt das Computerspektrum. Im rechten Teil ist der AB-Teil gespreizt dargestellt.

Für die beiden vicinalen Kopplungskonstanten wurden die Werte $^{3}J_{9\text{-}H,11\text{-}H\beta}$ = 9 Hz und $^{3}J_{9\text{-}H,11\text{-}H\alpha}$ = 6 Hz erhalten und für die chemischen Verschiebungen von 11-Hα (B-Teil) δ2.25 und 11-Hβ (A-Teil) δ2.30. Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen des AB-Teils ähneln denen des Salannins und des 3-Desacetylsalannins, so daß die Struktur des Moleküls in Bezug auf C-9 und C-11 als gesichert gelten kann.

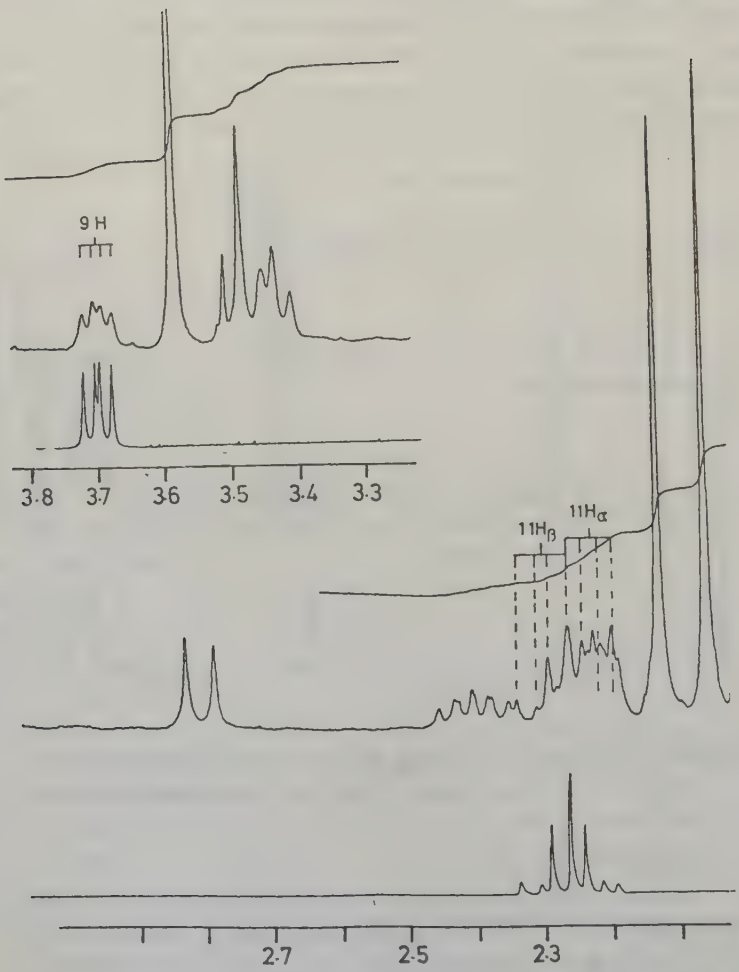


Abb. 26: AMX-System 9-H, 11-H$_{\alpha,\beta}$ von (31). Die untere Spur zeigt wieder das Computerspektrum.

Es bleibt noch die Analyse des AMXY-Systems 15-H, 16-H$_{\alpha,\beta}$ 17-H. 15-H (δ5.75) und 17-H (δ3.43) bilden wie beim Ohchinolid B breite Dubletts (^3J = 6.8 bzw. 8.6 Hz). Strahlt man auf 17-H ein, so vereinfacht sich das Signal (ddd) bei δ2.38

zu einem Doppeldublett mit den Kopplungskonstanten $^{3}J_{16\text{-H}\alpha,15\text{-H}}$ = 6.8 Hz und $^{2}J_{16\text{-H}\alpha,16\text{-H}\beta}$ = 15.5 Hz. Beim Sättigen von 15-H ist eine vicinale Kopplung von $^{3}J_{16\text{-H}\alpha,17\text{-H}}$ = 8.6 Hz zu beobachten. Wie zu erwarten werden 15-H und 17-H beim Einstrahlen auf das Signal (ddd) bei δ 2.38 zu Singuletts, außerdem wird das Dublett bei δ 1.56 ebenfalls ent-

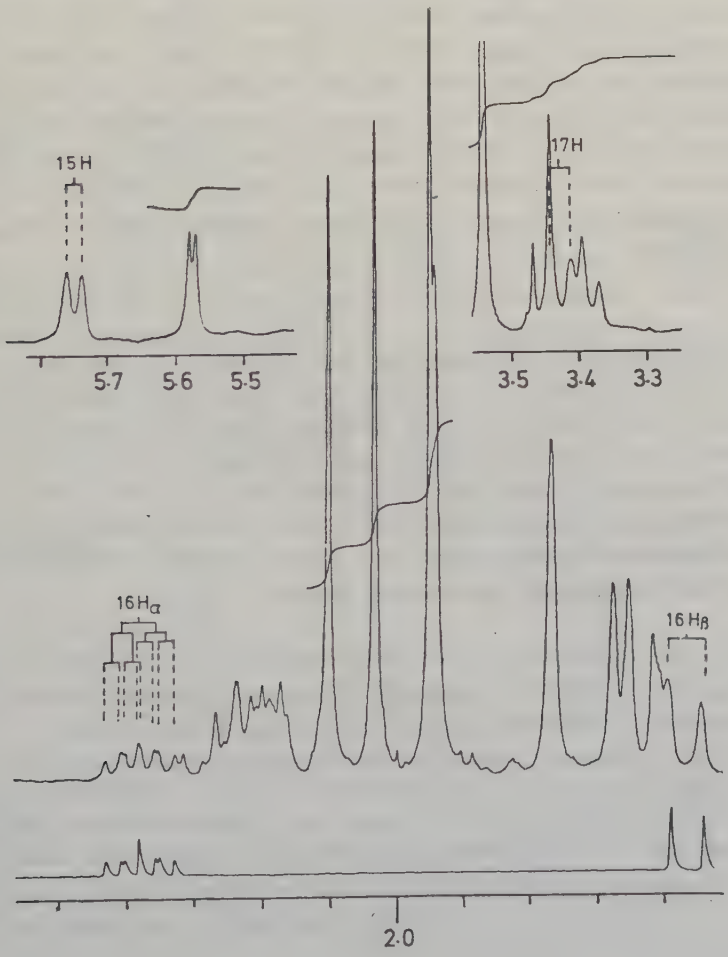


Abb. 27: Experimentelles Spektrum (obere Spur) und theoretisches Spektrum (AM-Teil, untere Spur) vom AMXY-System 15-H, 16-Hα,β, 17-H.

koppelt. Wird mit dessen Larmorfrequenz in das Protonenspektrum eingestrahlt, so wird aus dem Signal (ddd) bei δ2.38 wieder ein Doppeldublett mit den Kopplungskonstanten $^{3}J_{16\text{-H}\alpha\ 17\text{-H}}$ = 8.6 Hz und $^{3}J_{16\text{-H}\beta,15\text{-H}}$= 6.8 Hz. Die Ergebnisse zeigen, daß das Signal bei δ1.56 weder mit 17-H noch mit 15-H koppelt. Es wird deshalb in Analogie zum Ohchinolid B 16-Hβ zugeordnet. 15-H und 17-H koppeln jedoch beide mit dem Signal (ddd) bei δ2.38, das 16-Hα zugeordnet wird. Mit den gleichen Argumenten wie beim Ohchinolid B kann damit die Struktur des D-Ringes angegeben werden. Das AMXY-Spektrum wurde ebenfalls gerechnet und iteriert (Abb. 27). Die gleichen Entkopplungsexperimente wurden beim Nimbolidin A durchgeführt. Dadurch konnte auch dessen Struktur gesichert werden.

5.3.4 Die bevorzugte Orientierung des Ringes D in Lösung

Es stellt sich die Frage, welche bevorzugte Lage der nun frei um die Bindung C-8 - C-14 drehbare Ring D in Lösung einnimmt. Eine elegante Methode, sie zu beantworten, ist ein NOE-Experiment, bei dem 30-H gesättigt wird. Bei der Durchführung dieses Experimentes[58] (Kap. 5.3.7) konnte im Differenzspektrum jedoch kein Proton des 5-Ringes und auch keines des Furanringes beobachtet werden.

Eine andere Möglichkeit ist, den Phenylrest der Benzoyloxygruppe als "Sonde" zu benutzen. Dazu muß zunächst dessen Lage im Molekül bestimmt werden. Das kann durch den Vergleich der chemischen Verschiebung folgender Protonen erfolgen (Tabelle 10):

Tabelle 10: Vergleich der chemischen Verschiebung von Protonen, die durch die Anisotropie des Phenylrestes beeinflußt werden.

	(30)	(31)	Δ
5-H	3.03	2.84	0.19
6-H	4.22	4.14	0.08
7-H	5.76	5.58	0.18
9-H	3.83	3.70	0.13
28-H α	3.37	3.42	- 0.05
28-H β	3.46	3.49	- 0.03

Tabelle 10 zeigt, daß beim Nimbolidin A (30) alle Protonen außer 28-Hα u. β eine Tieffeldverschiebung erfahren. 28-Hα,β muß demnach über der Ebene des Benzolringes liegen. Diese Lage des Phenylrestes sollte, so zeigt das Modell, durch die chemische Verschiebung der Furanprotonen eine Aussage über die bevorzugte Lage des Fünfringes ermöglichen. In Tabelle 11 sind die chemischen Verschiebungen von 21-H, 22-H und 23-H einander gegenübergestellt.

Tabelle 11

	(30)	(31)	Δ
21-H	7.05	7.25	- 0.2
22-H	6.12	6.20	- 0.08
23-H	7.05	7.20	- 0.15

Der drastischen Hochfeldverschiebung von 21-H und 23-H nach zu urteilen, müssen sich diese Protonen oberhalb der Ringebene des Phenylrestes befinden. Das kann aber nur der Fall sein, wenn die Ebene des Fünfringes nahezu senkrecht auf der Ebene des Restmoleküls steht.

5.3.5 NOE-Experimente am Nimbolidin B (31)[58]

Durch Einstrahlen auf die drei angulären Methylgruppen 29-H, 19-H und 30-H konnten die Protonen 1-H, 3-H und 2-Hβ zugeordnet werden Tab. 12).

Tabelle 12: NOE-Experimente am Nimbolidin B (31) (s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach).

Eingestrahltes Signal	gefundenes Signal
1.16 (19-H)	4.94 (3-H w, 4.48 (1-H) s, 4.14 (6-H) s, 2.23 (2-Hβ) m, 1.25 (30-H) s
1.21 (29-H)	4.94 (3-H) s, 4.48 (1-H) vw, 4.14 (6-H) m, 2.23 (2-Hβ) w, 1.25 (30-H) m
1.25 (30-H)	4.14 (6-H) s

Die Methylgruppen 29-H und 19-H liegen bei den Nimbolidinen sehr nahe beieinander, so daß beim Einstrahlen immer auch die andere miterfaßt wird. Im Differenzspektrum kann deshalb beispielsweise beim Einstrahlen auf 29-H auch 19-H als negativer Peak gesehen werden und umgekehrt. Dementsprechend erfährt auch bei Sättigung von 29-H 1-H einen schwachen NOE. Durch die Intensitätsverhältnisse (siehe Tabelle 12) ist die Zuordnung dennoch eindeutig.

Tabelle 13: ^{1}H-NMR-Spektren von (30) und (31) (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm), bezogen auf TMS = 0; Kopplungskonstanten in Hz.

	(30)	(31)
1-H	4.52 (1H,t,J=3)	4.48 (1H,t,J=3)
2-Hα	2.22 (1H,dt,J=13 u. 3)	2.19 (1H,dt,J=13 u. 3)
2-Hβ	2.29 (1H,dt,J=13 u. 3)	2.23 (1H,dt,J=13 u. 3)
3-H	4.96 (1H,t,J=3)	4.94 (1H,t,J=3)

	(30)	(31)
5-H	3.03 (1h,d,J=12.7)	2.84 (1H,d,J=12.6)
6-H	4.22 (1H,dd,J=12.7u.2.8)	4.14 (1H,ss,J=12.6u.3)
7-H	5.76 (1H,d,J=2.8)	5.58 (1H,d,J=3)
9-H	3.83 (1H,dd,J=5.6 u. 8)	3.7 (1H,dd,J=6 u. 9)
11-Hα	2.33 (2H,m)	2.25 (1H,dd,J=14 u. 6)
11-Hβ		2.3 (1H,dd,J=14 u. 9)
15-H	5.82 (1H,d,J=7.0)	5.75 (1H,d,J=6.8)
16-Hβ	1.6 (1H,d,J=15)	1.56 (1H,d,J=15.5)
16-Hα	2.42 (1H,ddd,J=15,6.8u.8.5)	2.38 (1H,ddd,J=15.5,6.8u. 8.6)
17-H	3.41 (1H,d,J=8.5)	3.43 (1H,d,J=8.6)
18-H	1.87 (3H,s)	1.80 (3H,s)
19-H	1.2 (3H,s)	1.16 (3H,s)
21-H	-	7.25 (1H,m)
22-H	6.12 (1H,m)	6.2 (1H,m)
23-H	7.05 (2H,m)	7.2 (1H,m)
28-Hα	3.37 (1H,d,J=7.5)	3.42 (1H,d,J=7.5)
28-Hβ	3.46 (1H,d,J=7.5)	3.49 (1H,d,J=7.5)
29-H	1.23 (3H,s)	1.21 (3H,s)
30-H	1.3 (3H,s)	1.25 (3H,s)
CH_3CO	2.03 (3H,s)	2.0 (3H,s)
CH_3CO	2.16 (3H,s)	2.08 (3H,s)
CH_3CO	2.20 (3H,s)	2.15 (3H,s)
3'-H	-	6.81 (1H,qq,J=7 u. 1)
4'-H	-	1.7 (3H,dq,J=7)
5'-H	-	1.99 (3H,br.s)
Benzoyl-	7.33 (2H,t)	-
oxy	7.49 (1H,t)	-
	8.04 (2H,d)	-
$COOCH_3$	3.59 (3H,s)	3.58 (3H,s)

C-Atom	(30)	(31)
30	20.14 q	20.19 q
$COO\underline{C}H_3$	51.99 q	51.97 q
$H_3\underline{C}CO$	21.60 q	21.57 q
$H_3\underline{C}CO$	21.40 q	21.30 q
$H_3\underline{C}CO$	20.98 q	20.86 q
$H_3C\underline{C}O$	170.99 s	171.04 s
$H_3C\underline{C}O$	169.92 s	169.89 s
$H_3C\underline{C}O$	169.59 s	169.59 s
1′	-	166.62 s
2′	-	129.38 s
3′	-	136.29 d
4′	-	14.39 q
5′	-	12.40 q
1′	131.13 s	-
2′, 6′	129.79 d	-
3′, 5′	127.98 d	-
4′	132.70 d	-
7″	165.19 s	-

5.3.6 Überführung der Ohchinolide (28) und (29) in die Nimbolidine (30) und (31)

Die Behandlung von (28) und (29) mit methanolischer Kalilauge lieferte die Hydroxyester (34) und (35) (^{1}H-NMR-Spektren Abb. 28 und 29 und Tab. 15), die von Ochi[40] durch alkalische Hydrolyse und nachfolgende Veresterung mit Diazomethan erhalten worden waren. Durch Acetylierung von (34) und (35) konnten dann die Nimbolidine (30) und (31) erhalten werden. Damit ist die für (28) röntgenographisch von Ochi[40] und für (29) durch die NOE-Messung bestimmte β-Konfiguration der Sauerstoffunktion an C-15 und des Furanrings an C-17 auch für die Nimbolidine A und B (30) und (31) bewiesen.

Zur Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren wurden Selektiventkopplungsexperimente am Nimbolidin B durchgeführt, bei denen an 17 Punkten in das Protonenspektrum eingestrahlt wurde. Außerdem stand ein nach der "Gated-Decoupling-Methode" aufgenommenes Spektrum des Nimbolidin A zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: ^{13}C-NMR-Spektren von (30) und (31) (75.46 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) bezogen auf TMS = 0.

C-Atom	(30)	(31)
1	71.62 d	71.68 d
2	27.37 t	27.30 t
3	71.99 d	71.95 d
4	42.77 s	42.70 s
5	40.36 d	40.27 d
6	73.07 d	72.93 d
7	76.33 d	75.56 d
8	47.52 s	47.45 s
9	38.76 d	38.79 d
10	40.93 s	40.85 s
11	32.10 t	32.05 t
12	173.53 s	173.56 s
13	133.22 s	133.43 s
14	148.88 s	148.59 s
15	82.30 d	82.23 d
16	37.04 t	37.07 t
17	47.69 d	47.69 d
18	17.56 q	17.46 q
19	15.96 q	15.98 q
20	127.68 s	128.00 s
21	139.24 d	139.53 d
22	109.72 d	110.21 d
23	143.00 d	142.93 d
28	78.17 t	78.05 t
29	19.75 q	19.78 q

(34) R = Bz

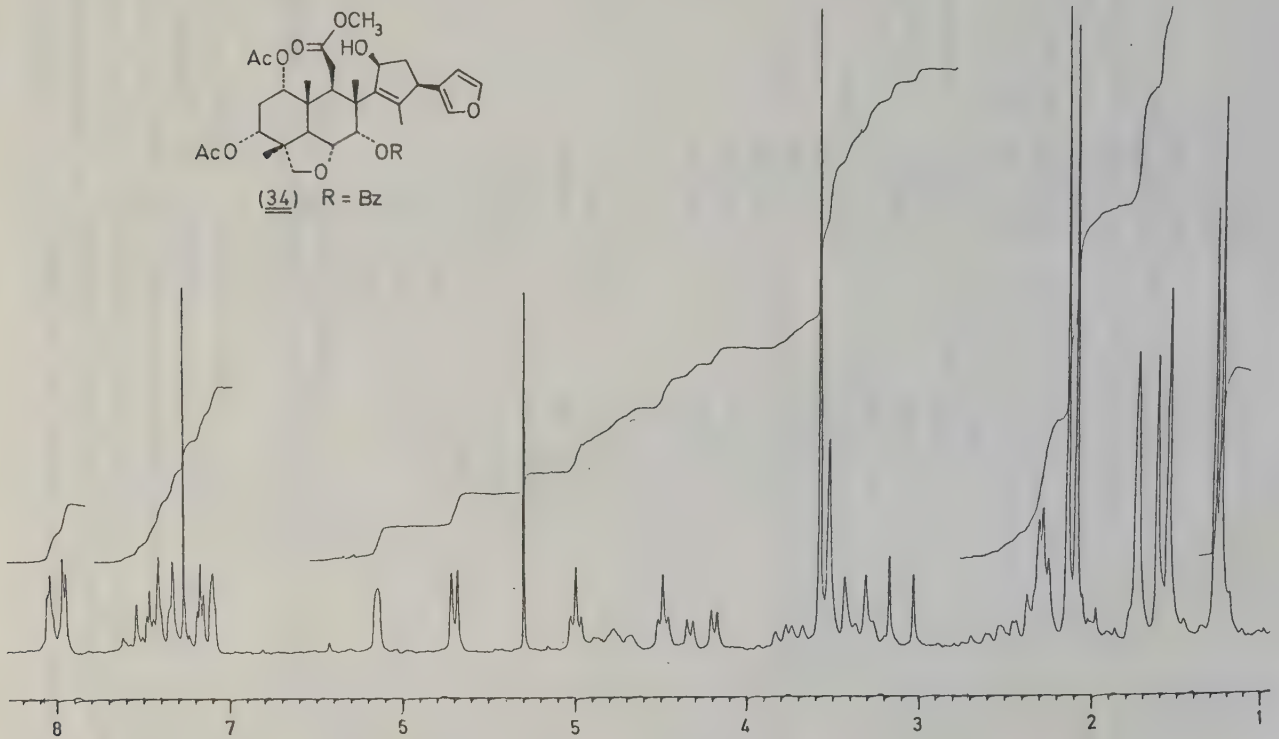


Abb. 28: ^{1}H-NMR von Ringöffnungsprodukt (34), (90 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

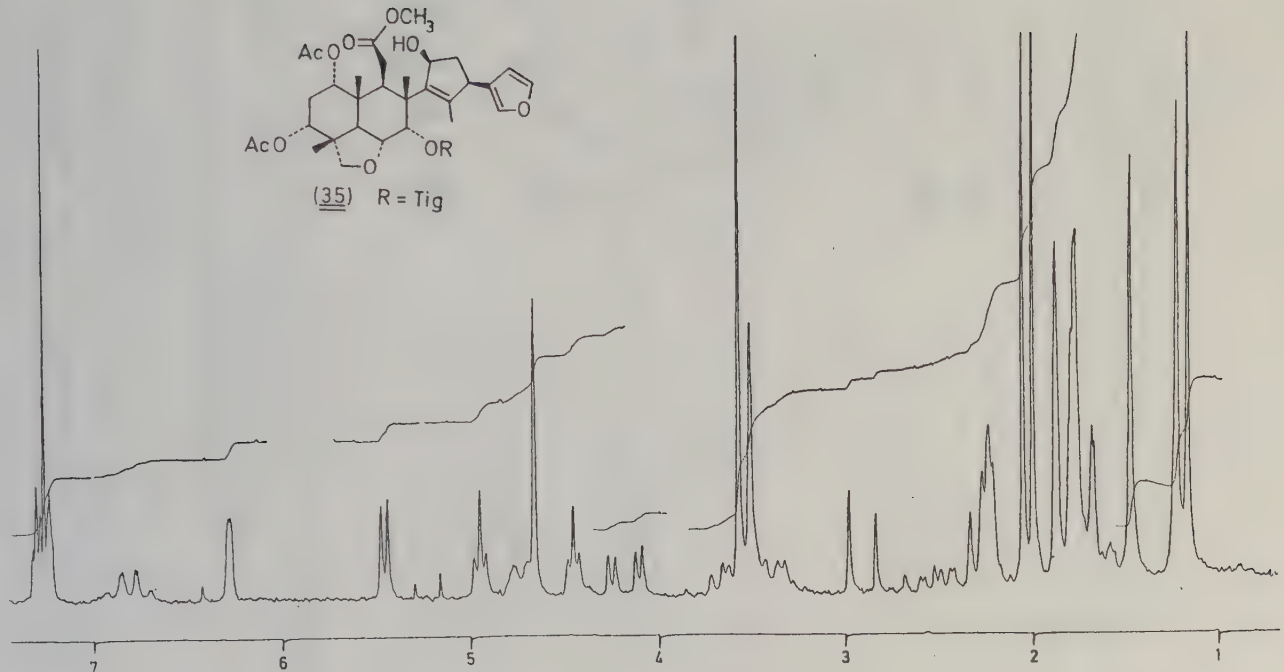
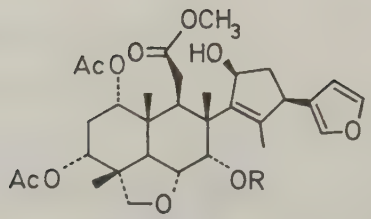


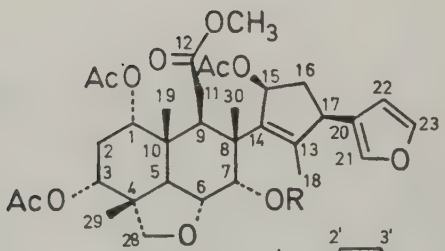
Abb. 29: ^{1}H-NMR von Ringöffnungsprodukt (35), (90 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

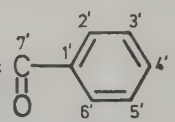
(28)
(29)
KOH/MeOH



(34) R = Bz
(35) R = Tig

Ac_2O/Pyridin



(30) R = 

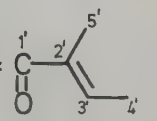
(31) R = 

Tabelle 15: ^{1}H-NMR-Daten der Ringöffnungsprodukte (34) und (35) der Ohchinolide [90 MHz, $CDCl_3$ δ(ppm) bezogen auf TMS = 0]

	(34)	(35)
1-H	4.49 (1H,t,J=3)	4.45 (1H,t,J=3)
2-Hα 2-Hβ	2-19 - 2.4 (2H,m)	2.35 - 2.18 (2H,m)
3-H	5.00 (1H,t,J=3)	4.95 (1H,t,J=3)

	(34)	(35)
5-H	3.10 (1H,d,J=13)	2.92 (1H,d,J=13)
6-H	4.27 (1H,dd,J=13 u. 3)	4.18 (1H,dd,J=13 u. 3)
7-H	5.70 (1H,d,J=3)	5.46 (1H,d,J=3)
9-H	3.76 (1H,dd,J=9 u. 5)	3.65 (1H,dd,J=9 u. 5)
11-Hα	2.22 - 2.39 (2H,m)	2.18 - 2.35 (2H,m)
11-Hβ		
15-H	4.78 (1H,br.d,J=8)	4.74 (1H,br.d,J=8)
16-Hβ	verdeckt	verdeckt
16-Hα	2.40 - 2.72 (1H,m)	2.70 - 2.37 (1H,m)
17-H	3.35 (1H,dd,J=4 u.10)	3.40 (1H,dd,J=4 u.10)
18-H	1.73 (3H,s)	1.77 (3H,s)
19-H	1.22 (3H,s)	1.17 (3H,s)
21-H	7.17 (1H,m)	7.30 (1H,m)
22-H	6.15 (1H,m)	6.28 (1H,m)
23-H	7.10 (1H,m)	7.24 (1H,m)
28-Hα,β	3.52 (2H,m)	3.51 (2H,m)
29-H	1.26 (3H,s)	1.24 (3H,s)
30-H	1.54 (3H,s)	1.48 (3H,s)
CH_3CO	2.08 (3H,s)	2.00 (3H,s)
CH_3CO	2.13 (3H,s)	2.05 (3H,s)
3'-H	-	6.82 (1H,qq,J=7 u. 1)
4'-H	-	1.73 (3H,dq,J=7 u. 1)
5'-H	-	1.88 (3H,br.s)
Benzoyl-	8.75 - 7.91 u.	-
oxy	7.64 - 7.3	-
$COOCH_3$	3.57 (3H,s)	3.57 (3H,s)

5.4 Strukturaufklärung des Nimbolinins B (32)

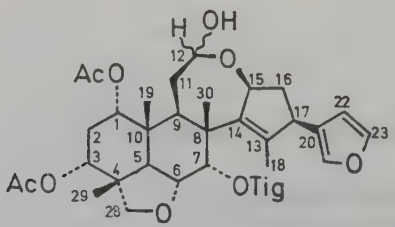
5.4.1 Bestimmung der Summenformel

Die Summenformel des Nimbolinin B wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu $C_{35}H_{46}O_{10}$ bestimmt[41]. Die daraus für den M^+-Peak berechnete Masse ($\frac{m}{e}$ = 626.3090)

stimmt mit der gefundenen ($\frac{m}{e}$ = 626.3103) gut überein.

5.4.2 Strukturaufklärung durch Vergleich der Protonenspektren[45] von (32) und Heudebolin (36) und der Protonen- und ^{13}C-NMR-Spektren[42] von (32) und (29)

Charakteristisch für (32) sind die bei 3450 cm^{-1} im Infrarotspektrum auftretende OH-Bande und das Fehlen des ^{13}C-Signals der ε-Lacton-Carbonylgruppe des Ohchinolid B bei δ171.22 (Tab. 18 und Abb. 30). Stattdessen tritt im Off-Resonance-Spektrum ein Dublett bei δ91.56 auf. Ebenfalls neu ist das Dublett bei δ77.44. Weitere Hinweise darauf, daß kein Lactonring vorliegt, geben die Hochfeldverschiebung des 15-H-Signals (δ5.19) um 0.38 ppm, verglichen mit dem Ohchinolid B (29) und ein Multiplett bei δ5.25 (Tab. 17) und Abb. 31). Durch D_2O-Austausch verschwindet das Signal bei δ2.42, während das Multiplett bei δ5.23 - 5.28 zu einem Triplett mit der Kopplungskonstante J = 3 Hz vereinfacht wird. Dieser Effekt läßt sich auch durch Einstrahlen auf das Signal bei δ2.42 erreichen. Hieraus ist zu schliessen, daß anstelle eines ε-Lactons ein Halbacetal vorliegt. Das breite Signal bei δ5.23 - 5.28 ist demnach 12-H zuzuordnen. (32) ist somit das von (29) abgeleitete Lactol. Hierauf deutet auch der Vergleich mit dem 300 MHz-Spektrum des uns als Vergleichssubstanz zur Verfügung stehenden Heudebolins (36) hin[59].



(36) R = Ac

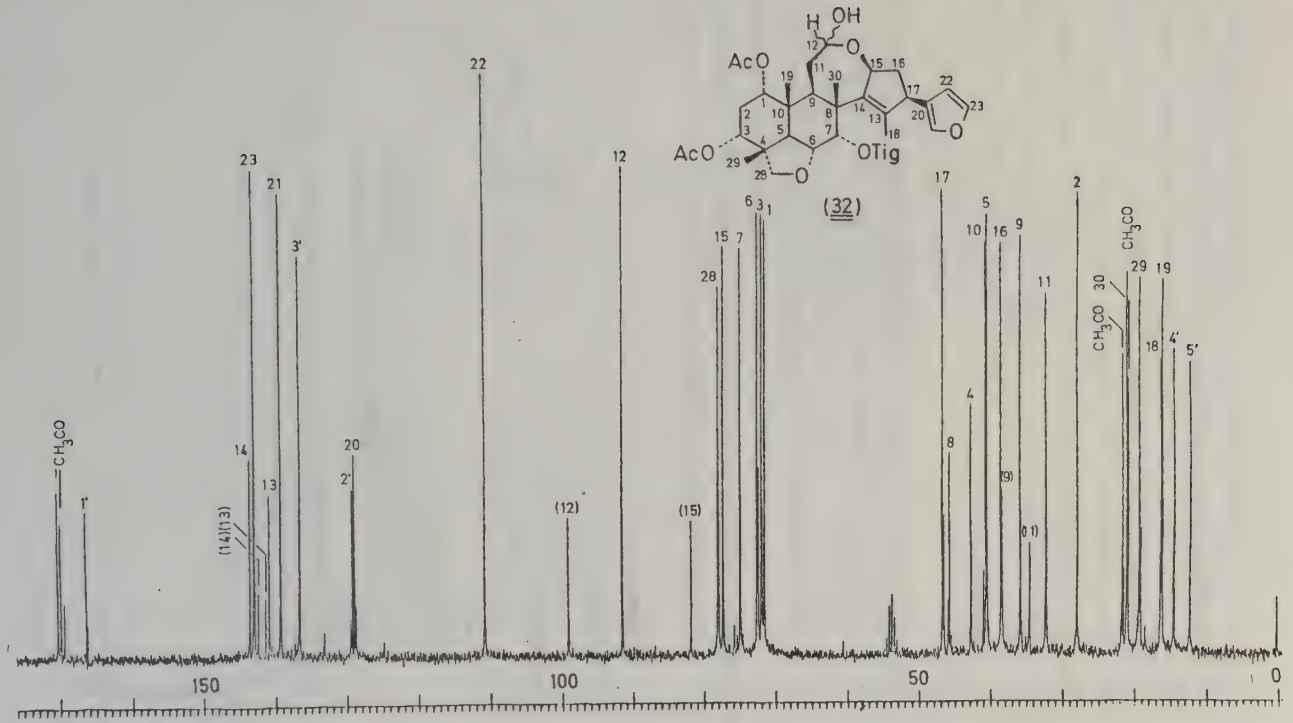


Abb. 30: ^{13}C-NMR von Nimbolinin B (32), (75.46 MHz, CD_2Cl_2), δ(ppm).

(32)

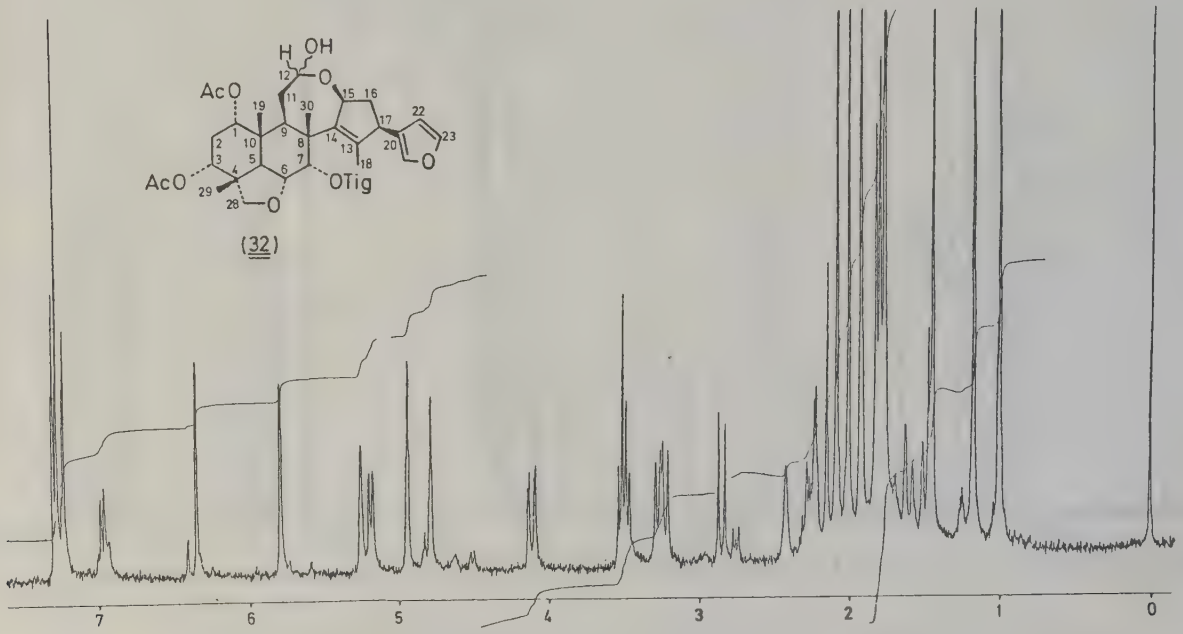


Abb. 31: ^{1}H-NMR von Nimbolinin B (32), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

Heudebolin wurde aus Trichilia heudelottii (Meliaceae) isoliert[60]. In Tabelle 16 sind sowohl die ^{1}H-NMR-Daten von (32), als auch die von (36) aufgeführt. Die Konfiguration von (36) an C-17 wird in der Literatur nicht einheitlich angegeben. In der Originalpublikation[60] wird der Furanring α-ständig gezeichnet, in einem Übersichtsartikel in "Terpenoids and Steroids"[61] jedoch β-ständig. Das wird in Kapitel 5.4.4 noch näher erläutert.

5.4.3 Die Zuordnung der Signale von C-12 und C-15 beider Epimeren durch Selektiventkopplung und Bestimmung der Konfiguration an C-12.

Ausgangspunkt der Überlegungen war ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der ^{13}C-NMR-Signale von C-1 und C-5 der α,β-D-Glucose[62] mit den entsprechend zugeordneten Signalen von C-12 und C-15 des α,β-Nimbolinin B (Abb. 32, Tab. 16).

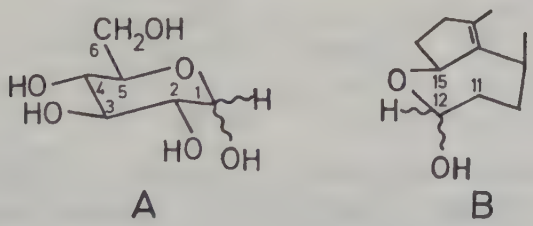


Abb. 32: α,β-D-Glucose (A) und ε-Lactolring des α,β-Nimbolinin B (B).

Tabelle 16: Vergleich der chemischen Verschiebung von C-1 und C-5 (Abb. 32 A) und C-12 und C-15 (Abb. 32 B) δ(ppm).

D-Glucose			Nimbolinin B		
C-Atom	α	β	C-Atom	α	β
1	95.35	98.95	12	91.56	99.19
5	74.35	78.95	15	77.44	81.93

Zum Beweis dieser Zuordnung durch Selektiventkopplungsexperimente müßten die Signale von 15-H und 12-H des β-Nimbolinin B im Protonenspektrum gefunden werden. Das war auch im 300 MHz-Spektrum nicht möglich. Deswegen wurde ihre Lage im Protonenspektrum grob abgeschätzt anhand von Literaturangaben über Substituenteneinflüsse im Cyclohexan[63] (Abb. 33).

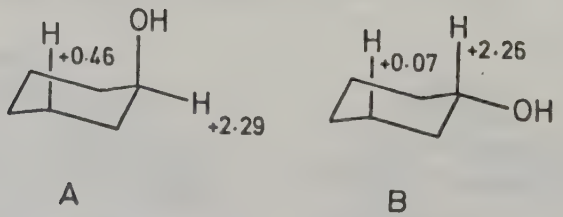


Abb. 33: Substituenteneinflüsse im Cyclohexan (+ bedeutet Verschiebung zu tieferem Feld, - bedeutet Verschiebung zu höherem Feld) δ(ppm).

Sowohl 15-H als auch 12-H des β-Nimbolinins wären also nach Abb. 33 bei höherem Feld zu suchen. Ein Beispiel aus der Literatur[28] zeigt, daß die Differenz der chemischen Verschiebung des zur Hydroxylgruppe des Lactols geminalen Protons zwischen der axialen und äquatorialen Position sogar noch größer ist (Abb. 34).

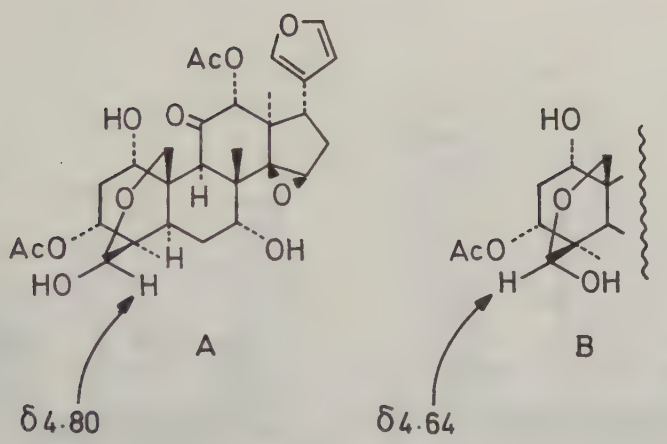


Abb. 34: Unterschied der chemischen Verschiebung von 28-H in 28-Desacetylsendanin[26] zwischen axialer Stellung (A) und äquatorialer Stellung (B).

Eine Entkopplung der dem β-Epimeren zugeordneten Signale von C-15 und C-12 wäre also zu erwarten, wenn bei höherem Feld in das Protonenspektrum eingestrahlt wird, als zur Entkopplung der entsprechenden ^{13}C-Resonanzen des α-Epimeren erforderlich.

Tatsächlich kann beobachtet werden, daß beim Einstrahlen auf 12-H in das Protonenspektrum das Signal bei δ91.56 voll entkoppelt wird, nicht jedoch das bei δ99.19. Wird nun mit der Larmorfrequenz von 3-H, also bei höherem Feld, in das Protonenspektrum eingestrahlt, so wird das dem β-Epimeren zuzuordnende Signal bei δ99.19 vollentkoppelt, während das des α-Epimeren (δ91.56) gespalten bleibt (Abb. 35).

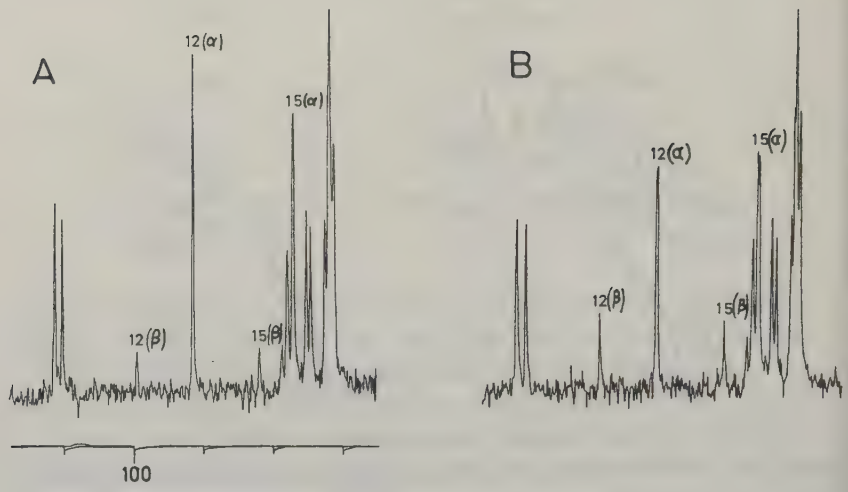


Abb. 35: Ausschnitt aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum des Nimbolinin B. In Abb. 35 A ist C-12 (α) durch Einstrahlen auf 12-H ins Protonenspektrum voll entkoppelt, während in Abb. 35 B beim Einstrahlen auf 3-H C-12 (α) noch gespalten ist, C-12 (β) jedoch deutlich schlanker und intensiver wird.

Wird nun auf 15-H in das Protonenspektrum eingestrahlt, so kann C-15 (α) aufgrund der Signalintensität zugeordnet werden. C-15 (β) ist jedoch noch gespalten und verschwindet fast im Rauschen. Entkoppelt wird C-15 (β) erst, wenn bei höherem Feld auf 1-H, in das Protonenspektrum eingestrahlt wird (Abb. 36).

Durch diese Experimente konnten die Signale von C-15 und C-12 der beiden Epimeren zugeordnet werden und bewiesen werden, daß das α-Epimer im Überschuß vorliegt. Das Verhältnis von α- zu β-Epimer beträgt laut PND-^{13}C-NMR-Spektrum etwa 3 : 1.

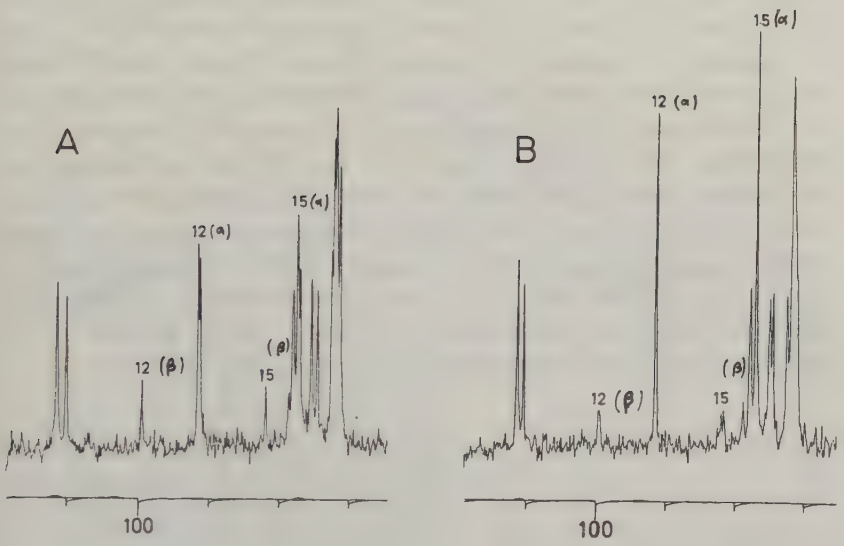


Abb. 36: Ausschnitt aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum zweier Selektiventkopplungsexperimente von (32): A: Einstrahlen auf 1-H; B: Einstrahlen auf 15-H

5.4.4 Das Spinsystem 9-H, 11-Hα,β und 12-H und die Konformation des ε-Lactols

Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse durch die Analyse des Spinsystems 9-H, 11-Hα,β und 12-H. Leider sind die Protonen an C-11 teilweise verdeckt durch Methylgruppensignale. Es konnte aber beim Einstrahlen auf 12-H beobachtet werden, daß die breiten Äste eines Dubletts bei δ1.63 durch Zusammenbrechen einer kleinen Kopplung schlanker wurden. Aufgrund ihres Intensitätsverhältnisses wurden sie dem B-Teil eines AB-Systems zugeordnet, der noch schwach gekoppelt ist mit weiteren Protonen. Die große Kopplungskonstante beträgt ^{2}J = 15 Hz. Erst beim Einstrahlen auf 9-H wird die kleine Kopplung von ^{3}J = 3 Hz sichtbar. Das Signal zeigt

also außer der geminalen Kopplung von 15 Hz eine vicinale zu 12-H von 3 Hz und eine sehr kleine, nicht aufgelöste, zu 9-H. Der Winkelabhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstanten entsprechend wurde es 11-Hα zugeordnet. Die Kopplung von 3 Hz entspricht der nach Aufhebung der HCOH-Kopplung sichtbaren von 12-H (t, ^3J = 3 Hz). 11-Hβ, das antiperiplanar zu 9-H steht, wird durch die Methylgruppensignale verdeckt. Das Signal muß zwei große Kopplungen ($^2J_{11\text{-H}\alpha,11\text{-H}\beta}$ = 15 Hz, $^3J_{11\text{-H}\beta,9\text{-H}}$ = 10 Hz) und eine kleine ($^3J_{11\text{-H}\beta,12\text{-H}}$ = 3 Hz) aufweisen. Mit diesen Daten wurde ein Spektrum simuliert, bei dem jedoch die OH-Gruppe an C-12 und die HCOH-Kopplung nicht berücksichtigt wurde (Abb. 37).

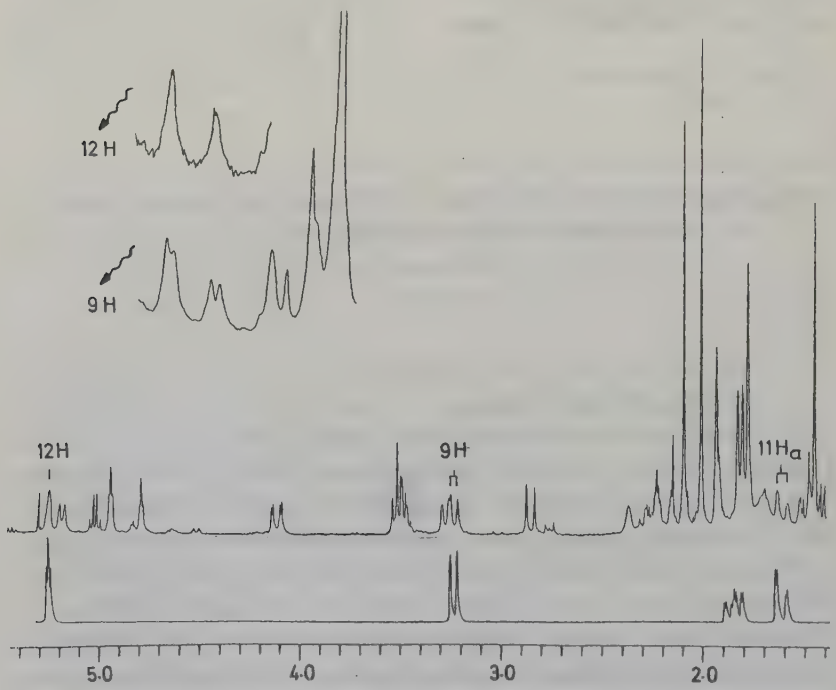


Abb. 37: Spinsystem 9-H, 11-Hα,β. Die untere Spur zeigt das simulierte Spektrum.

Diese Ergebnisse können nur so interpretiert werden, daß beim α-Epimeren des Nimbolins B 12-H (+) synclinal zu 11-Hα bzw. (-) synclinal zu 11-Hβ steht, also die Winkelhalbierende bildet. Damit muß der Siebenring in einer Sesselkonformation vorliegen (Abb. 32 B). Das Signal bei δ1.63 ist dann 11-Hα zuzuordnen, das etwa einen Winkel von 90° mit 9-H einschließt und deshalb nur eine kleine, nicht aufgelöste Kopplungskonstante mit 9-H besitzt. Die aus den NMR-Spektren abgeleitete Schlußfolgerung, daß zwei Epimere vorliegen, konnte durch analytische HPLC bestätigt werden (Abb. 38).

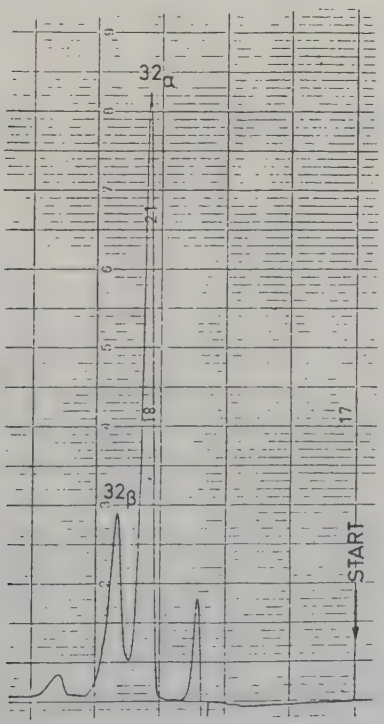
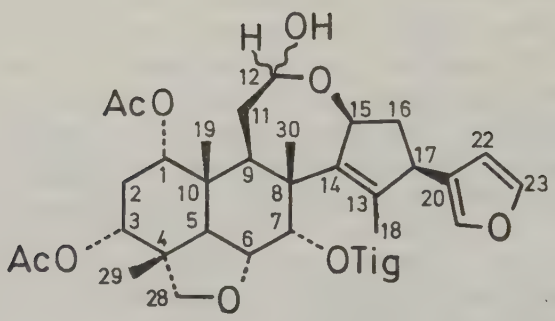


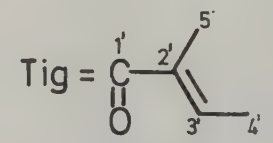
Abb. 38: Analytisches HPLC von (32), Ether/ Äthanol (98 : 2), 0.8 ml/ min UV (254 nm).

Die Beziehung zum Ohchinolid B wurde chemisch durch Oxidation mit CrO_3/ Pyridin hergestellt. Das Reaktionsprodukt entspricht in allen physikalischen Daten dem Ohchinolid B.

Dem Nimbolinin B kommt also die Struktur (32) zu.



(32)



Für das Ohchinolid B war die Konfiguration an C-17 durch ein NOE-Experiment eindeutig festgelegt worden. Das heißt, daß auch das Nimbolinin B einen β-ständigen Furanring besitzen muß. Dies wurde auch beim 1-Desacetylnimbolinin B, dessen Strukturaufklärung im folgenden Kapitel beschrieben wird, unabhängig davon durch ein NOE-Experiment bewiesen. Obwohl die zur Verfügung stehende Vergleichsprobe von Heudebolin (36) von schlechter Qualität ist, zeigt der Vergleich der ^{1}H-NMR-Daten, daß der Furanring auch hier β-ständig ist.
Die ^{1}H-NMR-Daten von (32) und (36) sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: ^{1}H-NMR-Spektren von (32) und (36) (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm), bezogen auf TMS = 0; Kopplungskonstanten in Hz.

	(32)	(36)
1-H	4.79 (1H,t,J=3)	4.75 (1H,t,J=3)
2-Hα	2.20 - 2.26 (2H,m)	2.30 - 2.18 (2H,m)
2-Hβ		
3-H	4.94 (1H,t,J=3)	4.93 (1H,t,J=3)
5-H	2.85 (1H,d,J=13)	2.74 (1H,d,J=12.9)
6-H	4.12 (1H,dd,J=13 u. 3)	4.08 (1H,dd,J=12.9u.2.5)
7-H	5.79 (1H,d,J=3)	5.60 (1H,d,J=2.5)
9-H	3.23 (1H,br.d,J=10)	3.15 (1H,d,J=10)
11-Hα	1.63 (1H,dd,J=15u.3)	verdeckt von Methyl-
11-Hβ	1.86 (1H,ddd,J=15,10u.3)	signalen
12-H	5.23 - 5.28 (1H,m)	5.27 - 5.20 (1H,m)
12-OH	2.39 - 2.52 (1H,m)	
15-H	5.19 (1H,d,J=8)	5.27 - 5.20 (1H,m)
16-Hβ	1.49 (1H,d,J=14)	1.56 (1H, d, J=14.5)
16-Hα	2.28 (1H,ddd,J=14,8u.9)	2.41 (1H, ddd, J=14.5,9.5,8)
17-H	3.27 (1H,d,J=9)	3.33 (1H,d,J=9.5)
18-H	1.78 (3H,s)	1.75 (3H,s)
19-H	1.00 (3H,s)	0.98 (3H,s)
21-H	7.30 (1H,m)	7.20 (1H,m)
22-H	6.35 (1H,m)	6.25 (1H,m)
23-H	7.23 (1H,m)	7.14 (1H,m)
28-Hα	3.46 (1H,d,J=7)	3.50 (1H,d,J=7.5)
28-Hβ	3.54 (1H,d,J=7)	3.55 (1H,d,J=7.5)
29-H	1.18 (3H,s)	1.17 (3H,s)
30-H	1.45 (3H,s)	1.43 (3H,s)
CH_3CO	2.09 (3H,s)	2.04 (6H,s)
CH_3CO	2.01 (3H,s)	2.08 (3H,s)
3'-H	6.97 (1H,qq,J=7 u. 1)	
4'-H	1.82 (3H,m)	
5'-H	1.93 (3H,d,J=1)	

5.4.5 Die Zuordnung des ^{13}C-NMR-Spektrums

Neben den schon geschilderten Selektiventkopplungsexperimenten wurde zur Zuordnung der anderen C-Atome an 11 weiteren Punkten in das Protonenspektrum eingestrahlt, wodurch alle C-Atome sicher zugeordnet werden konnten. Außer C-15 und C-12 sind noch C-13, C-14, C-9 und C-11 verdoppelt. Diese Signale wurden aufgrund ihrer Multiplizitäten und bei C-13 und C-14 durch den Vergleich ihres Intensitätsverhältnisses mit dem der Hauptsignale zugeordnet. Durch Selektiventkopplungen war dies nicht möglich, da die Signalseparierung bei den mit einer Meßfrequenz von 22.63 MHz aufgenommenen Spektren dazu nicht ausreicht. In Tabelle 18 sind die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten aufgeführt.

Tabelle 18: ^{13}C-NMR-Spektrum von (32) (75.46 MHz, $CDCl_3$), (ppm) bezogen auf TMS = 0.

C-Atom			C-Atom	
1	71.58 d		19	16.07 q
2	27.98 t		20	129.00 s
3	72.03 d		21	139.35 d
4	42.84 s		22	110.83 d
5	40.53 d		23	143.00 d
6	72.65 d		28	78.10 t
7	75.00 d		29	19.49 q
8	45.78 s		30	20.84 q
9	35.84 d	(38.41)+)	H_3CCO	21.02 q
10	40.77 s		H_3CCO	21.69 q
11	32.26 t	(34.59)	H_3CCO	170.56 s
12	91.56 d	(99.19)	H_3CCO	170.13 s
13	140.99 s	(141.47)	1'	166.55 s
14	143.61 s	(142.55)	2'	129.31 s
15	77.44 d	(81.93)	3'	136.69 d
16	38.56 t		4'	14.45 q
17	46.78 d		5'	12.25 q
18	16.25 q			

+) Signale des β-Epimeren

5.5 Strukturaufklärung von 1-Desacetylnimbolinin B (33)

5.5.1 Hochauflösung und Summenformel[64)]

Da die Intensität des M^+-Peaks im Massenspektrum für die Hochauflösung nicht ausreichte, wurde zur Bestimmung der Bruttoformel $C_{33}H_{44}O_9$ der M^+-18-Peak ausgewertet. Ber. M^+-18 $\frac{m}{e}$ 566.2874, gef. M^+-18 $\frac{m}{e}$ 566.2878.

5.5.2 Vergleich der ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR-Spektren von (32) und (33)[42)45)]

Auffällig beim 1-Desacetylnimbolinin B (33) ist das Fehlen der Signalverdopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum (Tabelle 21, Abb. 39). Das zeigt, daß (33) nicht als Epimerengemisch vorliegt. Außerdem fehlt je ein Signal im Estercarbonylbereich und im Methylbereich. Daraus und aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (Tabelle 20, Abb. 40) geht hervor, daß (33) eine Acetylgruppe weniger erhält als (32). Im übrigen sind sich die ^{13}C-NMR-Spektren von (32) und (33) sehr ähnlich.

Im Protonenspektrum hingegen fehlt eines der charakteristischen Tripletts von 1-H bzw. 3-H. Stattdessen treten 3 neue Signale auf bei δ3.61 - 3.68 (1H,m). Das Signal von 9-H, im Protonenspektrum von (32) ein Dublett, ist hier ein Doppeldublett mit den Kopplungskonstanten ^{3}J = 7.5 und 2.5 Hz.

5.5.3 Die Bestimmung der Position der verbleibenden Acetylgruppe und die Zuordnung der drei neuen Multipletts

Die Stellung der verbleibenden Acetylgruppe konnte nur durch NOE-Differenzmessungen (Tabelle 19) festgelegt werden: Beim Einstrahlen auf 19-H erfährt das Multiplett bei δ3.61 - 3.67 einen NOE. Daß es sich hierbei um das der OH-Gruppe benachbarte Proton handelt, folgt aus der Aufhebung der H-C-OH-Kopplung beim D_2O-Austausch. Das Signal wird hierbei zu einem Triplett mit einer Kopplungskonstante von 3 Hz vereinfacht. Die Hydroxylgruppe befindet sich demnach an C-1 und die verbleibende Acetoxygruppe an C-3. Zwischen den

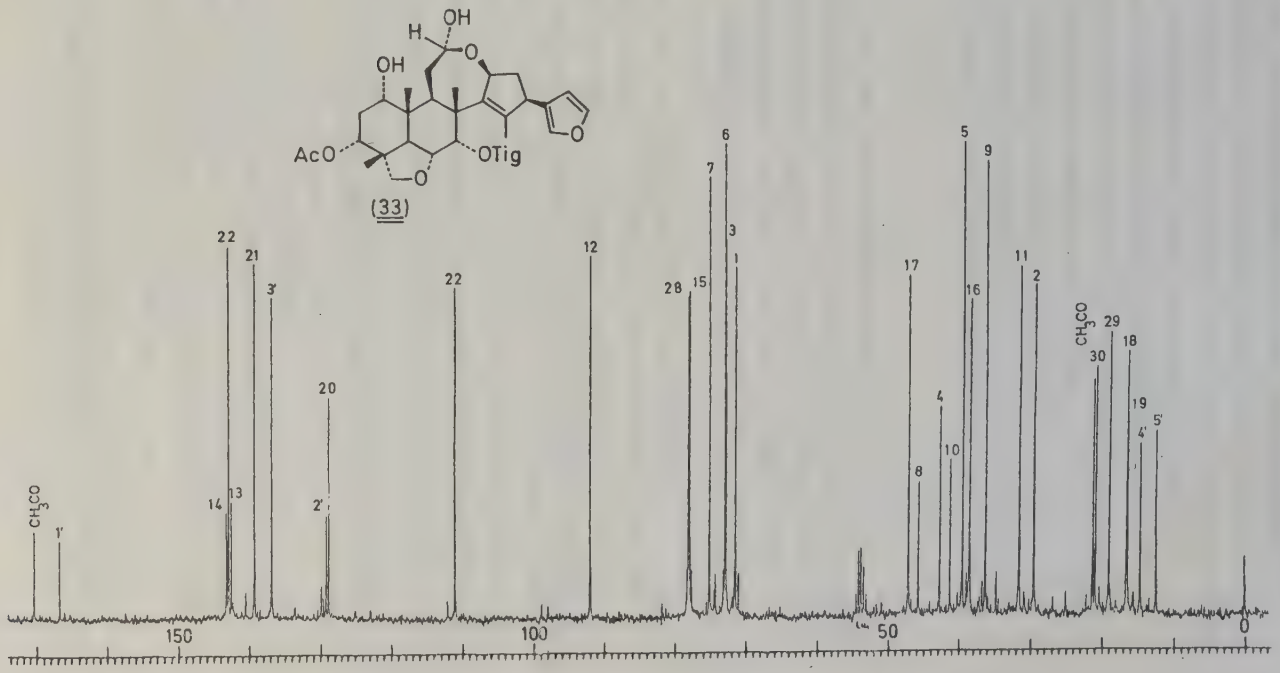


Abb. 39: ^{13}C-NMR von 1-Desacetylnimbolinin B (33), (75.46 MHz, CD_2Cl_2), δ(ppm).

(33)

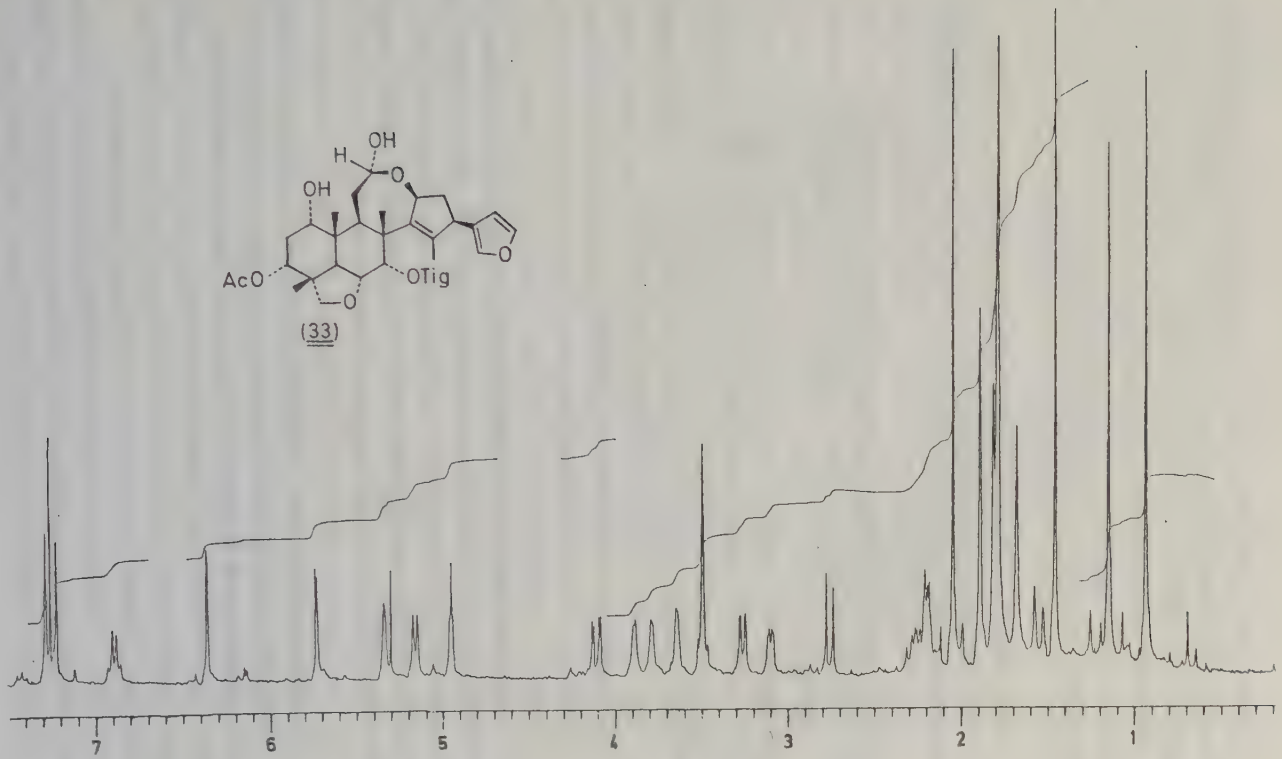


Abb. 40: ^{1}H-NMR von 1-Desacetylnimbolinin B (33), (300 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

Hydroxylgruppen an C-1 und C-12 kann durch Entkopplungsexperimente unterschieden werden. Beim Einstrahlen auf das Signal bei δ 3.86 - 3.93 vereinfacht sich 1-H zu einem Triplett. Es handelt sich also um das OH-Proton an C-1. Einstrahlen auf das Multiplett bei δ 3.71 - 3.82 führt zur Entkopplung des 12-H-Signals zu einem Triplett.

Außer dem bereits erwähnten NOE-Experiment wurde auch noch auf die angulären Methylgruppen 29-H und 30-H eingestrahlt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Ergebnisse der NOE-Experimente an (33)
(s = stark, m = mittel, w = schwach).

0.93 (19-H)	3.61 - 3.67 (1-H) s, 2.22 (2-H$_\beta$) w, 4.12 (6-H) s, 1.16 (29-H) s, 1.47 (30-H) s
1.16 (29-H)	4.95 (3-H) s, 3.50 (28-H$_\beta$) m, 4.12 (6-H) m, 0.93 (19-H) s, 1.47 (30-H) s
1.47 (30-H)	4.12 (6-H) m, 5.74 (7-H) s, 6.37 (22-H) w, 7.23 (23-H) w, 0.93 (19-H) s, 1.16 (29-H) s

Beim Sättigen von 30-H sind auch die Furanprotonen 22-H und 23-H im Differenzspektrum sichtbar. Dadurch ist die β-Stellung des Furanrings eindeutig bewiesen. Auch die Signale von 1-H, 2-H$_\beta$, 28-H$_\beta$ und der Methylgruppen konnten durch die Experimente eindeutig zugeordnet werden.

5.5.4 Beeinflussung der Stereochemie des Moleküls durch die Nachbarschaft der Hydroxylgruppen an C-1 und C-12

Die Betrachtung des Modells des 1-Desacetylnimbolinins zeigt, daß die beiden Hydroxylgruppen an C-1 und C-12 unmittelbar benachbart sind. Das erste Indiz für eine bestehende Wechselwirkung ist die bei niedrigen Wellenzahlen (3420 cm^{-1}) erscheinende OH-Valenzschwingung im IR-Spektrum. Noch deutlicher zeigt aber die Tieffeldverschiebung von 12-OH von δ 2.46 (Nimbolinin B) nach δ 3.80, daß hier eine Wasser-

stoffbrückenbindung vorliegen muß. Ein empfindlicher Indikator für eine damit verbundene Änderung der Konformation des Lactolrings ist die Kopplungskonstante von 9-H zu 11-Hα,β. Beim Nimbolinin B ist das Signal von 9-H in ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von ^3J = 10 Hz aufgespalten. Es liegt also nur eine Kopplung der antiperiplanar stehenden Protonen 9-H und 11-Hβ vor. 9-H und 11-Hα hingegen bilden einen Winkel von nahezu 90° und koppeln deshalb nicht. Anders ist es beim 1-Desacetylnimbolinin B. Hier bildet 9-H ein Doppeldublett mit der Kopplungskonstanten ^3J = 7.5 und 2.5 Hz. Die Erklärung hierfür kann nur sein, daß durch die Bildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Hydroxylgruppen an C-12 und C-1 11-Hβ etwas ringeinwärts gebogen wird. Dadurch wird der Winkel zwischen 9-H und 11-Hα über 90° hinaus vergrößert und es tritt wieder eine kleine Kopplung 9-H, 11-Hα von 2.5 Hz auf. Nun kann auch das Fehlen der eigentlich analog zum Nimbolinin B zu erwartenden doppelten Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum erklärt werden: Durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung wird das α-Epimere so stabilisiert, daß das Gleichgewicht fast völlig zugunsten des α-Epimeren verschoben ist. Die Acetylierung von (32) ergab ein Produkt, das im ^{1}H-NMR-Spektrum (exper. Teil) die Signale dreier Acetoxygruppen besitzt und ein Doppeldublett bei δ6.26 mit den Kopplungskonstanten ^3J = 4 und 5 Hz, das 12-H zuzuordnen ist. Die Aufspaltung der Acetyl- und Methylgruppen im ^{1}H-NMR-Spektrum beweist, daß auch hier zwei Epimeren vorliegen. Das gleiche Produkt wurde bei der Acetylierung von (33) erhalten, auch hier zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum wieder das Vorhandensein zweier Epimeren an. Es muß also während der Acetylierung eine Epimerisierung an C-12 erfolgt sein. Eine Trennung durch HPLC gelang nicht.

Tabelle 20: ^{1}H-NMR-Spektrum von (33) (300 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm), bezogen auf TMS = 0; Kopplungskonstanten in Hz.

1-H	3.61 - 3.67 (1H,m)
2-Hα	2.15 (1H,dt,J=16 u. 3)
2-Hβ	2.22 (1H,dt,J=16 u. 3)
3-H	4.95 (1H,d,J=3)
5-H	2.76 (1H,d,J=12.5)
6-H	4.12 (1H,dd,J=12.5 u. 3)
7-H	5.74 (1H,d,J=3)
9-H	3.10 (1H,dd,J=7.5 u. 2.5)
11-Hα	2.05 (1H,m)
11-Hβ	2.26 (1H,m)
12-H	5.13 - 5.38 (1H,m)
12-OH	3.77 - 3.82 (1H,m)
15-H	5.17 (1H,d,J=8)
16-Hβ	1.55 (1H,d,J=14)
16-Hα	2.26 (1H,ddd,J=14, 8 u. 9)
17-H	3.27 (1H,d,J=9)
18-H	1.78 (3H,s)
19-H	0.93 (3H,s)
21-H	7.30 (1H,m)
22-H	6.37 (1H,m)
23-H	7.23 (1H,m)
28-Hα 28-Hβ	3.5 (2H,br.s)
29-H	1.16 (3H,s)
30-H	1.47 (3H,s)
CH_3CO	2.05 (3H,s)
3'-H	6.89 (1H,qq,J=7 u. 1)
4'-H	1.80 (3H,br.d,J=7)
5'-H	1.88 (3H,d,J=1)
OH	3.86 - 3.93 (1H,m)

Die ^{13}C-NMR-Daten wurden durch Selektiventkopplungsexperimente zugeordnet (Tabelle 21).

Tabelle 21: ^{13}C-NMR-Spektrum von (33) (75.46 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm) bezogen auf TMS =0.

C-Atom		C-Atom	
1	71.51 d	18	16.48 q
2	29.51 t	19	16.30 q
3	72.86 d	20	128.91 s
4	42.75 s	21	139.36 d
5	39.57 d	22	110.93 d
6	72.95 d	23	142.99 d
7	75.13 d	28	78.10 t
8	45.69 s	29	18.93 q
9	36.34 d	30	20.85 q
10	41.31 s	H_3CCO	21.21 q
11	31.61 t	H_3CCO	170.62 s
12	92.00 d	1′	166.86 s
13	142.63 s	2′	129.30 s
14	143.29 s	3′	136.93 d
15	77.95 d	4′	14.56 q
16	38.53 t	5′	12.37 q
17	47.12 d		

6. Isolierung und Strukturaufklärung von 3-Tigloylohchinin (37) aus in Griechenland geernteten Früchten von Melia Azedarach L.

6.1 Abtrennung des 3-Tigloylohchinins (37) von den Tetranortriterpenoiden (28) - (33)

Außer dem jugoslawischen Material wurden auch Früchte untersucht, die in Griechenland (Athen) geerntet worden waren. Die Extraktion und Aufarbeitung der Früchte erfolgte wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben. Aus 72 kg getrockneten Früchten konnten 207.6 g Extrakt gewonnen werden. Die nachfolgende Chromatographie an 4.5 kg Kieselgel mit Petrolether/ Essigestergemischen als Fließmittel wurde ebenfalls unter den in Kapitel 5.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. In den beiden letzten von insgesamt 8 erhaltenen Fraktionen befanden sich die bereits beschriebenen Tetranortriterpenoide (28) - (33). Beide Fraktionen wurden wiederum zunächst von unpolaren Bestandteilen durch Filtration über eine RP-18-Säule befreit. Aus Fraktion 7 (13.4 g) wurden drei Fraktionen erhalten, die dritte (1.6 g) enthielt (37).

Das komplexe Substanzgemisch wurde zunächst durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an LiChroprep Si 60, 15-25 µ (Merck) mit Methylenchlorid/ Äthanol (97:3) aufgetrennt. Die dritte Fraktion (205 mg) enthielt (37). Zur weiteren Anreicherung waren noch zwei weitere chromatographische Trennungen unter Druck an einer Kieselgelsäule erforderlich. (Fließmittel: Methylenchlorid/ Essigester (80:20). Die Substanz schien nun dünnschichtchromatographisch rein zu sein [Laufmittel: Methylenchlorid/ Essigester (80:20)]. Die analytische HPLC [RP-18, Methanol/ Wasser (80.20)] zeigte jedoch, daß ein Gemisch von mindestens zwei Substanzen vorlag. Mit dem gleichen Trennsystem gelang die Abtrennung von (37). Nach dem Eindestillieren und Umkristallisieren aus Essiges-

ter/ Pentan konnten 40 mg erhalten werden (Schmp.: 120 - 125°C (Zers.) α_D^{20} = + 176° ($CHCl_3$, c=1).

6.2 Strukturaufklärung des 3-Tigloylohchinins (37).

6.2.1 Hochauflösung des M^+-Peaks und Summenformel[41)]

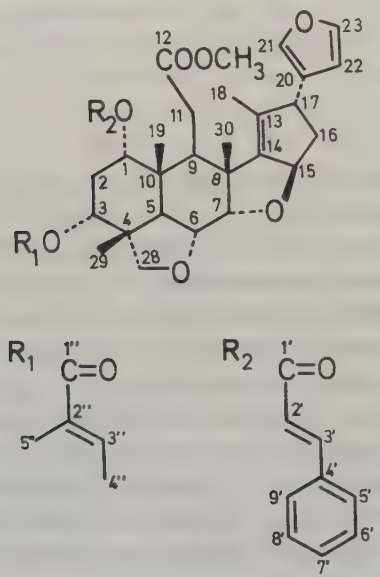
Die Summenformel $C_{41}H_{48}O_9$ des 3-Tigloylohchinins folgt aus der Hochauflösung des M^+-Peaks. Ber.: $M^+ \frac{m}{e}$ = 684.3298, gef.: $M^+ \frac{m}{e}$ = 684.3297.

6.2.2 Aufklärung der Struktur durch Spektrenvergleich mit dem 3-Acetylohchinin (22).

Eine Fülle von Substanzen mit dem Grundgerüst des Salannins sind seit dessen Strukturaufklärung in Meliaceen gefunden worden. Ein Vergleich der Protonenspektren und ^{13}C-NMR-Spektren des Salannins und einiger seiner Derivate[65)] zeigt, daß, von den jeweiligen Substituenten abgesehen, sowohl zwischen ihren ^{13}C-NMR-Spektren, als auch ihren Protonenspektren große Übereinstimmung besteht. Das Grundgerüst des neu gefundenen Tetranortriterpenoids (37) konnte deshalb leicht bestimmt werden. Auffällig ist jedoch im ^{1}H-NMR-Spektrum von (37) ein AB-System [B-Teil: δ6.41, 1H, d; A-Teil: δ7.72, (1H, d)] und ein Multiplett im Aromatenbereich δ7.18 - 7.37, (5H, m) . Der Vergleich mit dem Protonenspektrum des 3-Acetylohchinins (22)[27)] ergab, daß es sich hier um einen Zimtsäurerest handeln muß. Statt des Singuletts der Acetoxygruppe von (22) treten aber im ^{1}H-NMR-Spektrum von (37) die Signale der Tigloyloxygruppe auf. Bis auf die Position der beiden funktionellen Gruppen ist somit die Struktur bekannt.

Der Phenylrest der Cinnamoyloxygruppe an C-1 übt einen abschirmenden Effekt auf den Methylester aus. Beim Salannin, das an C-1 einen Tigloyloxyrest besitzt, absorbiert die Methoxygruppe bei δ3.28. Auch hier ist schon eine Abschirmung

des normalerweise bei tieferem Feld erscheinenden Methylestersignals durch die Doppelbindung festzustellen. In (37) jedoch ist das Signal noch einmal um 0.13 ppm hochfeldverschoben und besitzt eine chemische Verschiebung von δ3.15. Dies ist nur durch den starken Anisotropieeffekt des Phenylrestes zu erklären. Die Struktur von (37) ist damit gesichert.



(37)

Das 90 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum ist in Abb. 41 wiedergegeben und das ^{13}C-NMR-Spektrum in Abb. 42. In Tabelle 22 sind die ^{1}H-NMR-Daten von (37) aufgelistet, während Tabelle 23 eine Gegenüberstellung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des 3-Acetylohchinins (22)[27] und (37) zeigt. Die ^{13}C-NMR-Daten wurden im wesentlichen durch den Vergleich der Spektren von (22) und (37) zugeordnet, in Zweifelsfällen

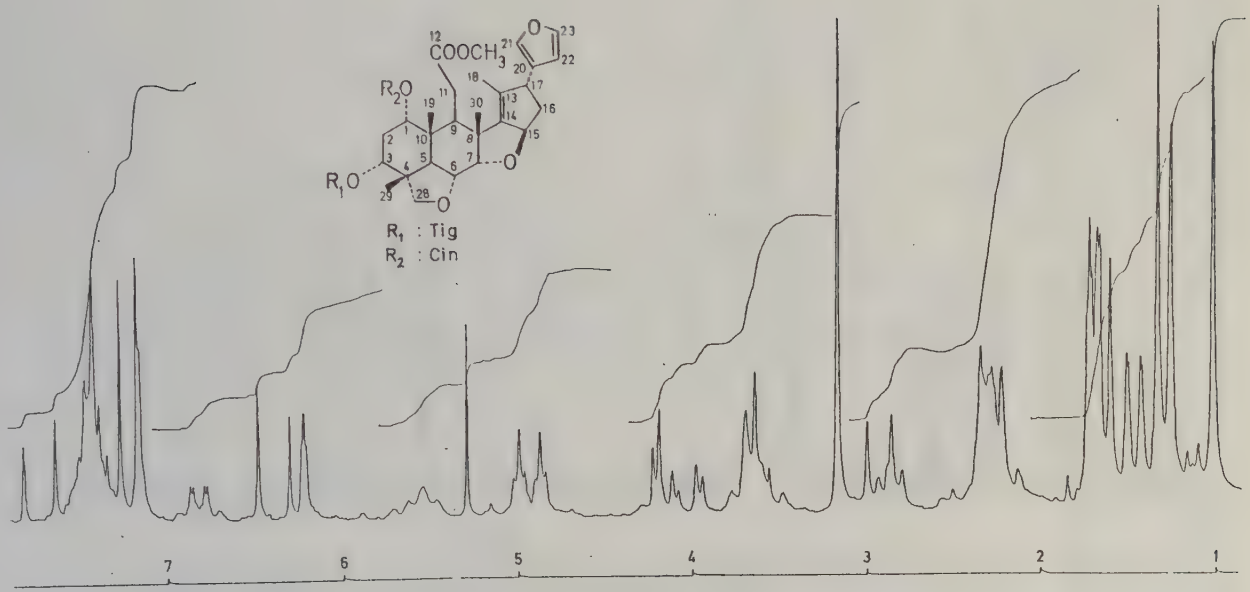


Abb. 41: ^{1}H-NMR von 3-Tigloylohchinin (37), (90 MHz, $CDCl_3$), δ(ppm).

wurde die Residualkopplung im "Off-Resonance-Spektrum" berücksichtigt.

Tabelle 22: ^{1}H-NMR-Daten von (37) (90 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm), bezogen auf TMS = 0, Kopplungskonstanten in Hz.

1-H	4.89 (1H,t,J=3)
2-H	ca. 2.31
3-H	5.01 (1H,t,J=3)
5-H	2.93 (1H,d,J=12)
6-H	4.04 (1H,dd,J=12 u. 3)
7-H	4.22 (1H,d,J=3)
9-H	2.85 (1H,dd,J=12 u. 3)
15-H	5.52 - 5.61 (1H,m)
17-H	3.65 (1H,d,J=8)
18-H	1.67 (3H,d,J=1.5)
19-H	1.02 (3H,s)
21-H	7.16 (1H,m)
22-H	6.23 (1H,m)
23-H	7.16 (1H,m)
28-Hα	3.62 (1H,d,J=8)
28-Hβ	3.73 (1H,d,J=8)
29-H	1.26 (3H,s)
30-H	1.33 (3H,s)
2'-H	6.41 (1H,d,J=16)
3'-H	3.72 (1H,d,J=16)
4'-9'-H	7.18 - 7.37 (5H,m)
3''-H	6.82 (1H,qq,J=1 u. 7)
4''-H	1.45 (1H,dq,J=1 u. 7)
5''-H	1.73 (1H,d,J=1)
$COOCH_3$	3.15 (3H,s)

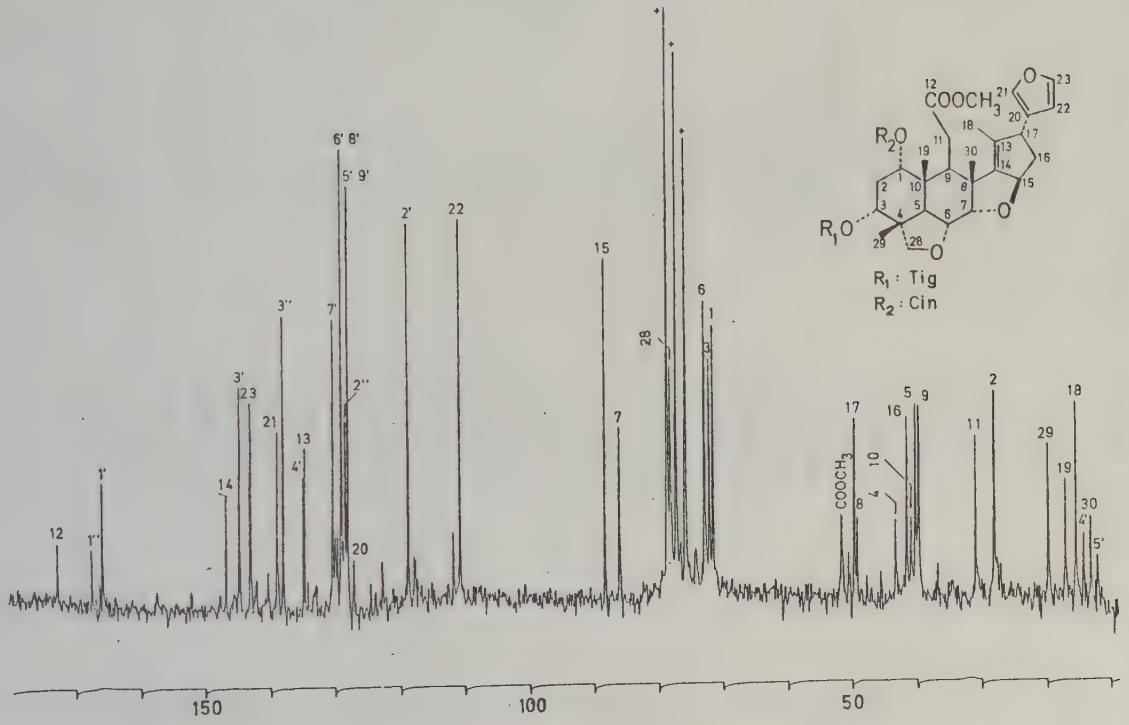


Abb. 42: ^{13}C-NMR von 3-Tigloylohchinin, (22.63 MHz, $CDCl_3$), δ ppm.

Tabelle 23: ^{13}C-NMR-Spektren von (37) und (22) (22.63 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm), bezogen auf TMS = 0.

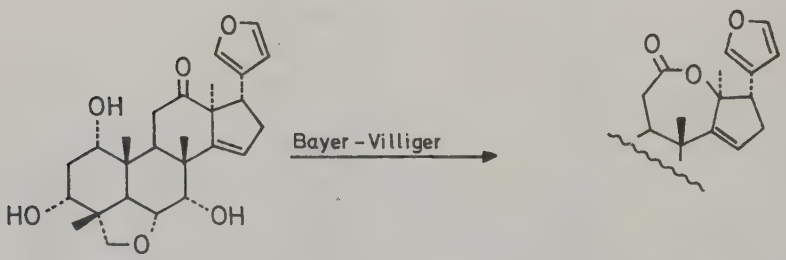
C-Atom	(37)	(22)	
1	71.51 d	71,7 d	+
2	27.95 t	27.7 t	
3	72.09 d	72.6 d	+
4	43.23 s	42.7 s	
5	40.24 d	39.9 d	
6	72.81 d	71.3 d	+
7	86.00 d	85.8 d	
8	49.06 s	49.1 s	
9	39.65 d	39.5 d	
10	40.89 s	40.7 s	
11	30.88 t	30.7 t	
12	172.85 s	172.6 s	
13	134.69 s	134.9 s	
14	146.78 s	146.4 s	
15	88.28 d	88.0 d	
16	41.47 t	41.3 t	
17	49.66 d	49.4 d	
18	15.41 q	15.2 q	
19	17.03 q	16.9 q	
20	127.10 s	126.9 s	
21	138.85 d	138.6 d	
22	110.70 d	110.4 d	
23	143.00 d	142.8 d	
28	78.07 t	77.6 t	
29	19.70 q	19.6 q	
30	13.20 q	13.0 q	
$COOCH_3$	51.61 q	51.5 q	
1'	165.96 s	165.4 s	
2'	118.70 d	118.7 d	
3'	144.70 d	144.6 d	
4'	134.95 s	134.3 s	
5', 9'	128.06 d	127.9 d	

C-Atom	(37)	(22)
6′, 8′	129.10 d	129.0 d
7′	130.40 d	130.3 d
1″	167.52 s	-
2″	128.15 s	-
3″	138.00 d	-
4″	12.16 q	-
5″	14.24 q	-

+ Zuordnung unsicher

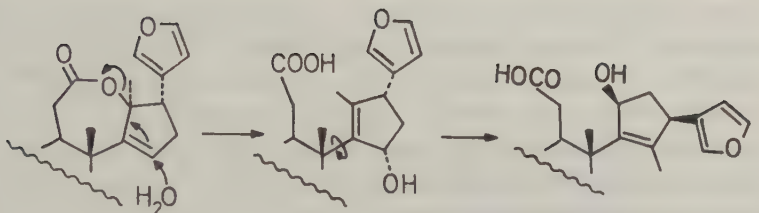
7. Überlegungen zur Biosynthese der neuen Tetranortriterpenoide (28) - (33) und (37)

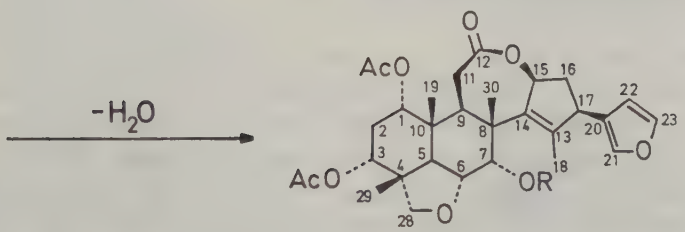
Die vom Salannin und dem 3-Tigloylohchinin (27) abweichende Konfiguration der Substanzen (28) - (33) im Ring D wirft die Frage nach der Biogenese der C-seco-Tetranortriterpenoide auf. In Analogie zur B- und D-Ringöffnung, die in der Literatur[66] experimentell durch Bayer-Villiger-Reaktion der entsprechenden Ketone nachvollzogen wurde, könnte als Vorläufer ein 12-Oxo-Tetranortriterpenoid betrachtet werden, beispielsweise das Nimbidinin (38)[67], das durch die Bayer-Villiger-Reaktion in das Lacton (39) übergeht.



(38) (39)

(39) besitzt jedoch eine andere Struktur als die Ohchinolide (28) und (29), so daß diese wiederum als Folgeprodukte verstanden werden müssen. Ihre Biosynthese könnte durch Öffnung des Lactonrings unter gleichzeitiger Hydroxylierung an C-15 erklärt werden. Die Hydroxylierung muß an der dem Furanring zugewandten Seite des Fünfringes erfolgen. Drehung des Rings um 180° und erneute Lactonbildung führt dann bei entsprechender Veresterung der Hydroxylgruppen im Nimbidinin (38) zu den Ohchinoliden (28) und (29).





(28) : R=Tig

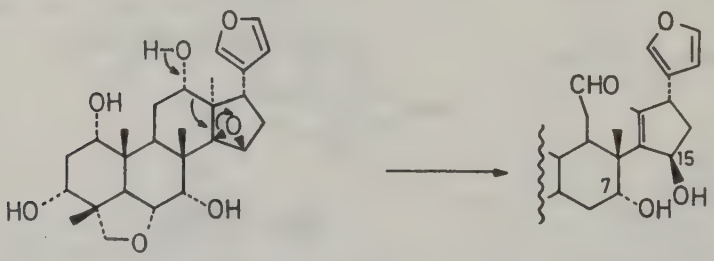
(29) : R=Bz

Durch die Drehung des Fünfrings um 180° wird also der Furanring β-ständig.

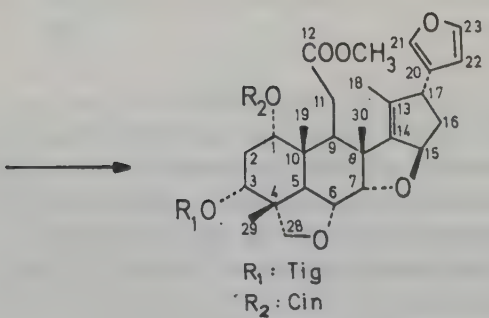
Die Nimbolidine (30) und (31) können sich nun aus (28) und (29) durch Öffnung des Lactonrings und Veresterung bilden, wie es in vitro durch alkalische Methanolyse von (28) und (29) mit nachfolgender Acetylierung nachvollzogen werden konnte. Daß sowohl die Ohchinolide (28) und (29), als auch die Nimbolidine paarweise vorliegen, zeigt ihre biogenetische Verwandtschaft.

Das Nimbolinin B (32) schließlich ist als Reduktionsprodukt des Ohchinolids B (29) aufzufassen. Leider konnte das Pendant mit Benzoyloxygruppe an C-7, das Nimbolinin A, noch nicht isoliert werden.

Anders jedoch muß die Biogenese des 3-Tigloylohchinins (37) verlaufen. Von Ochi wurde ein Vorschlag zur Biogenese von C-seco-Tetranortriterpenoiden des Salannintyps gemacht[26]. Als Vorläufer wurde ein 14,15-Epoxy-12-hydroxytetranortriterpenoid wie z.B. (40) postuliert, das durch eine synchron ablaufende Fragmentierung[68] in (41) übergeht. Daraus entsteht dann 3-Tigloylohchinin (37) durch Etherbildung zwischen C-7 und C-15, Oxidation der Aldehydfunktion zur Carboxylgruppe und Veresterung der Carboxylgruppe und der Hydroxylgruppen an C-1 und C-3.



(40) (41)



(37)

Die Fixierung des Ringes D durch die Etherbrücke bedingt die α-Position des Furanrings. An C-17 liegt jedoch die gleiche Konfiguration vor, wie bei (28) und (29), die durch die Drehung des Fünfrings um 180° einen β-ständigen Furanring besitzen. Geändert hat sich aber die Konfiguration an C-15. Sie wird durch die β-Stellung des Epoxidrings in (40) bedingt, wie sie bisher bei allen Tetranortriterpenoiden mit 14, 15-Epoxidring gefunden wurde.

Eine Möglichkeit, den Unterschied zwischen den Tetranortriterpenoiden (28) - (33) und dem 3-Tigloylohchinin (37) bezüglich der Konfiguration an C-15 zu erklären, ist also die Postulation zwei verschiedener Vorläufer: Ein 12-Oxo-Tetranortriterpenoid, z.B. das Nimbidinin, wandelt sich nach dem geschilderten Mechanismus in die Substanzen (28) - (33) um, während ein 12-Hydroxy-14,15-epoxyvorläufer, beispielsweise (40) in die Salanninreihe führt, wozu auch (37) gehört.

8. Prüfung der isolierten Tetranortriterpenoide (28) - (33) auf fraßhemmende Wirkung.

8.1 Testmethode

Bei Arbeiten über die insektenfraßhemmende Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen erwies sich der mexikanische Bohnenkäfer Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae) als geeignetes, empfindliches Versuchstier für Antifeeding-Tests[12]. Seine Aufzucht und Haltung im Labor ist unproblematisch und die Versorgung mit seiner Wirtspflanze, der Buschbohne Phaseolus vulgaris, ist das ganze Jahr über gesichert. Da die Larven des Bohnenkäfers besonders im L_4-Stadium großen Blattfraß zeigen, wurden diese für Versuchszwecke verwendet. Für den Test werden 6 Bohnenblätter in die methanolische Testlösung und 1 Blatt als Kontrolle in reines Methanol getaucht und anschließend mit einem Föhn sofort getrocknet. Die behandelten Blätter und die Blindprobe werden dann mit der Blattunterseite nach oben auf jeweils eine angefeuchtete Filterpapierscheibe gelegt. Die so gegen rasches Austrocknen geschützten Blätter kommen in Petrischalen und werden mit einer Maske, die ein ausgestanztes Loch (ø 4.2 cm) aufweist bedeckt. Jede Larve in solch einer Kammer hat damit während der 24-stündigen Versuchsdauer die gleiche Blattfläche von 14 cm^2 zum Fraß zur Verfügung.

8.2 Testergebnisse

Unter den genannten Versuchsbedingungen wurden bei den Blindproben die Blattausschnitte bis auf die Blattnerven abgefressen. Die Tests wurden generell bei zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, 0.01 und 0.005 %. Vom Nimbolidin B (29) und Nimbolinin B (32) wurde auch eine 0.0025 % Lösung getestet. Die Testergebnisse sind in Tabelle

24 aufgeführt.

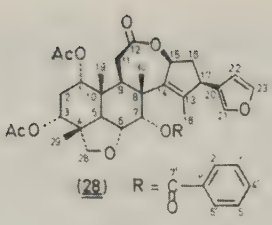
Tabelle 24: Ergebnisse der Antifeeding-Tests[69)]

Substanz	Konzentration[+)] %
Ohchinolid A (28)	0.01
Ohchinolid B (29)	0.01
Nimbolidin A (30)	0.01
Nimbolidin B (31)	0.005
Nimbolinin B (32)	0.01
1-Desacetylnimbolinin B (33)	0.1

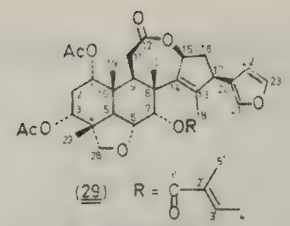
[+)]Grenzkonzentration für völlige Fraßhemmung.

8.3 Diskussion der Testergebnisse

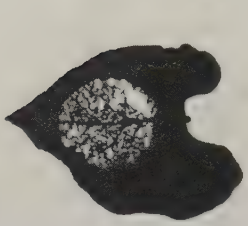
Die aktivste Substanz im Fraßtest ist das Nimbolidin B (31). Noch bei 0.0025 % sind kaum Fraßspuren an den Blättern festzustellen. Die Ohchinolide, das Nimbolidin A und Nimbolininin B zeigen durchweg bei 0.01 % noch völlige Fraßhemmung. Interessant ist der Vergleich des Nimbolinin B (32) mit dem 1-Desacetylnimbolinin B (33). Während (32) bei 0.01 % völlige Fraßhemmung zeigt, werden die mit (33) behandelten Blätter bis auf die Blattnerven gefressen. (33) mit einer Hydroxylgruppe an C-1 ist also zehnmal weniger wirksam als (29). Auf den folgenden Seiten sind die Antifeeding-Tests der 6 Substanzen dargestellt, die mit 0.01-proz. und 0.005-proz. methanolischen Lösungen durchgeführt wurden.

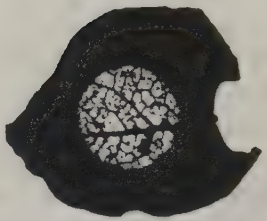


(28) R =

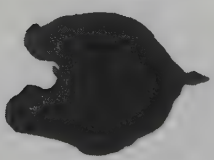


(29) R =

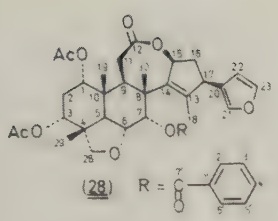




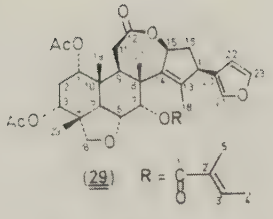
KONTROLLEN



0.01 %



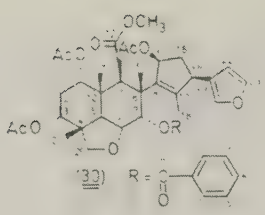
(28) R =



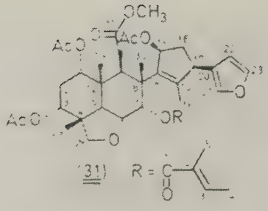
(29) R =

KONTROLLEN

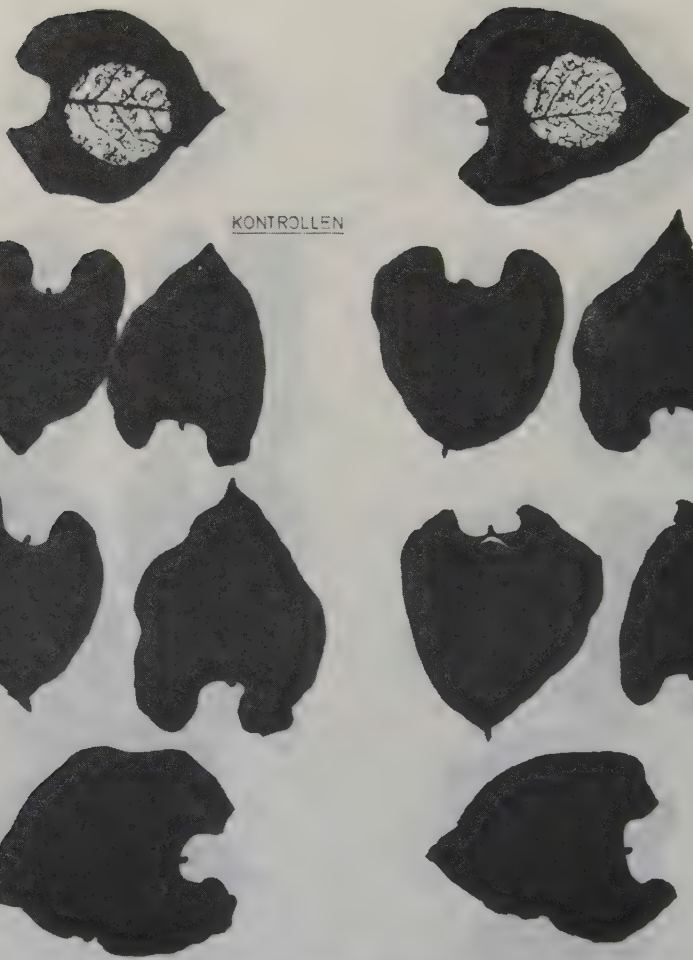
0.005%

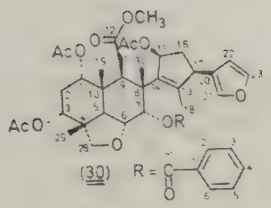

OCH3
AcO
AcO
AcO
OR
O
O
R =
O
O

(30)

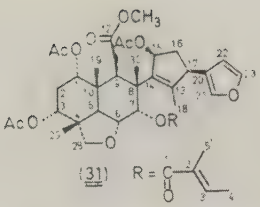

OCH3
AcO
AcO
AcO
OR
O
O
R =
O
O

(31)


KONTROLLEN
0,01%



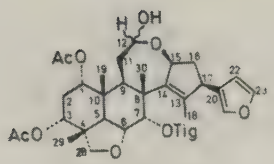
(30) R = C(=O)–C6H5



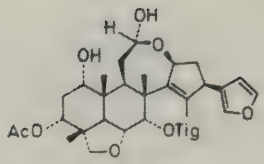
(31) R = C(=O)–C(CH3)=CH–CH3

KONTROLLEN

0.005%

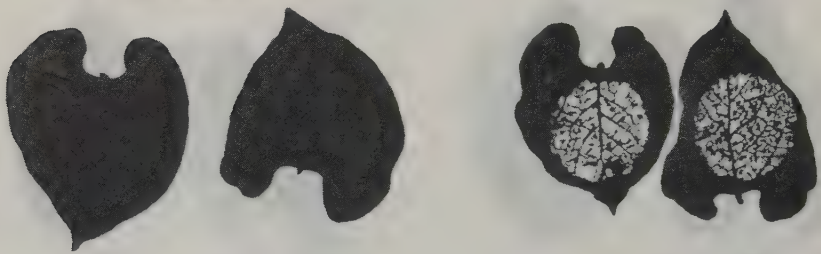


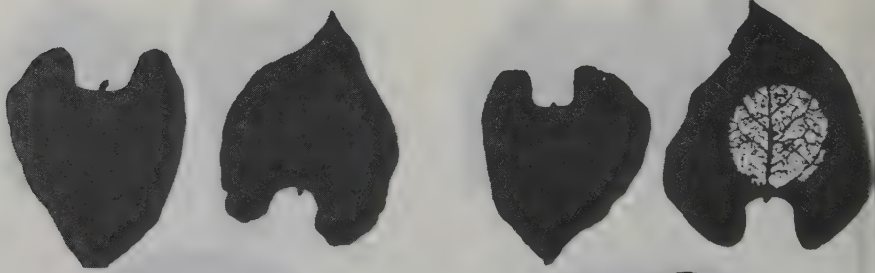
(32)



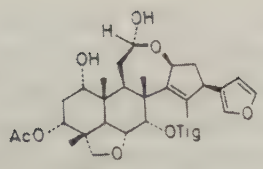
(33)

KONTROLLEN

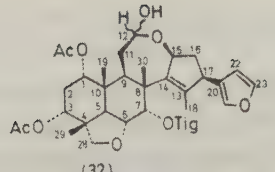




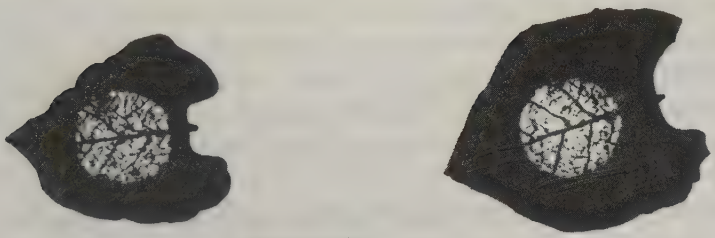
0·01%



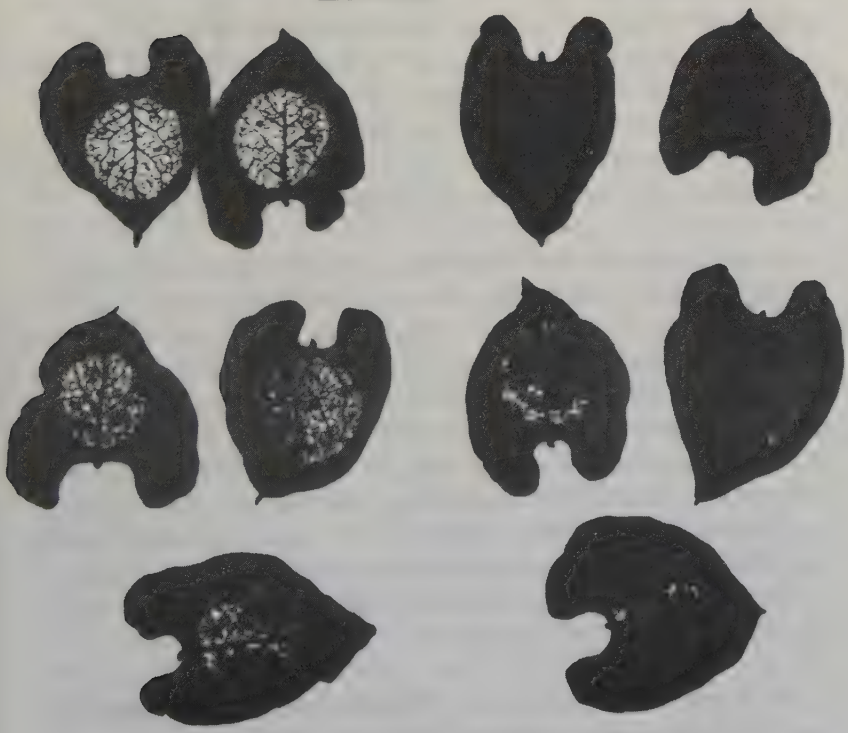
(33)



(32)



KONTROLLEN



0.005%

9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Strukturaufklärung von neuen triterpenoiden Inhaltsstoffen aus den Früchten von Melia azedarach L. (Meliaceae) beschrieben. Die Untersuchung auf Triterpenoide wurde unter dem besonderen Aspekt der Fraßhemmung auf Insekten geführt, wobei als geeignetes, empfindliches Versuchstier der mexikanische Bohnenkäfer Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae) dae) diente. Untersucht wurde Pflanzenmaterial aus Poreč und Osor, Jugoslawien, und aus Athen.

Aus den Früchten aus Osor konnten drei schon bekannte Triterpenoide, das Melianon (25), Melianol (26) und Melianodiol (27) isoliert werden, deren Strukturen durch Vergleich der physikalischen Daten (Schmp., IR, MS und ^{1}H-NMR) mit denen der Literatur bestimmt wurden. Außerdem konnte ein Coumarinderivat isoliert werden, das 6-Methoxy-7-hydroxycoumarin "Scopoletin" (24). Bei diesem Vorversuch wurde ausschließlich mit offenen Säulen gearbeitet.

Die Aufarbeitung der Früchte aus Poreč lieferte 6 neue Tetranortriterpenoide: Die Ohchinolide A (28) und B (29), die Nimbolidine A (30) und B (31), das Nimbolinin B (32) und ein Derivat hiervon, das 1-Desacetylnimbolinin B (33). Die Nimbolidine und Ohchinolide unterscheiden sich jeweils nur durch die Estergruppe an C-7 (Benzoyloxy beim Ohchinolid A und Nimbolidin A bzw. Tigloyloxy beim Ohchinolid B und Nimbolidin B). Die Isolierung des Benzoyloxyanalogons des Nimbolinins B steht noch aus. Die Trennung der 6 Verbindungen war teilweise schwierig und gelang nur durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit selbstgepackten Hochleistungssäulen.

Durch die 300 MHz ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR-, IR- und MS-Spektren von (28) und (29) und NOE-Messungen am Ohchinolid B (29) konnte die Struktur der Ohchinolide aufgeklärt werden. Mit

diesen vier spektroskopischen Methoden gelang auch die Strukturaufklärung der Nimbolidine A (30) und B (31). Bei der Interpretation der ^{1}H-NMR-Spektren erwies sich die Computersimulation und -Iteration einiger Spinsysteme als sehr hilfreich. Die bevorzugte Lage des bei den Nimbolidinen frei drehbaren Fünfringes konnte durch die Auswirkung der Anisotropie des Phenylringes auf die Furanprotonen 21-H, 22-H und 23-H bestimmt werden. Wiederum wurden die stereochemischen Verhältnisse im Molekül durch NOE-Messungen am Nimbolidin B aufgeklärt. Durch alkalische Methanolyse des Lactonringes und nachfolgende Acetylierung konnten die Ohchinolide (28) und (29) in die Nimbolidine (30) und (31) überführt werden, deren Strukturen damit auch chemisch bewiesen wurden.

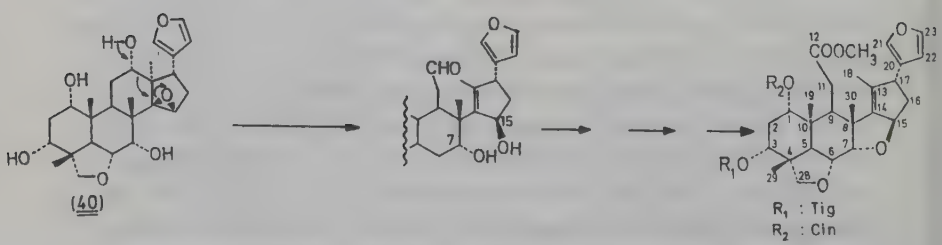
Ebenfalls mit spektroskopischen und chemischen Methoden wurde die Struktur des Nimbolinins B (32) aufgeklärt. Signalverdopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum zeigen, daß ein Epimerengemisch vorliegt, bedingt durch den ε-Lactolring. Durch Selektiventkopplung konnten die Signale von C-12 und C-15 der beiden Epimeren zugeordnet werden. (32) konnte durch Oxidation mit CrO_3/ Pyridin in das Ohchinolid B (29) überführt werden. Das beweist, daß (32) das von (29) abgeleitete Lactol ist. Es gelang nicht, die Substanz zu kristallisieren.

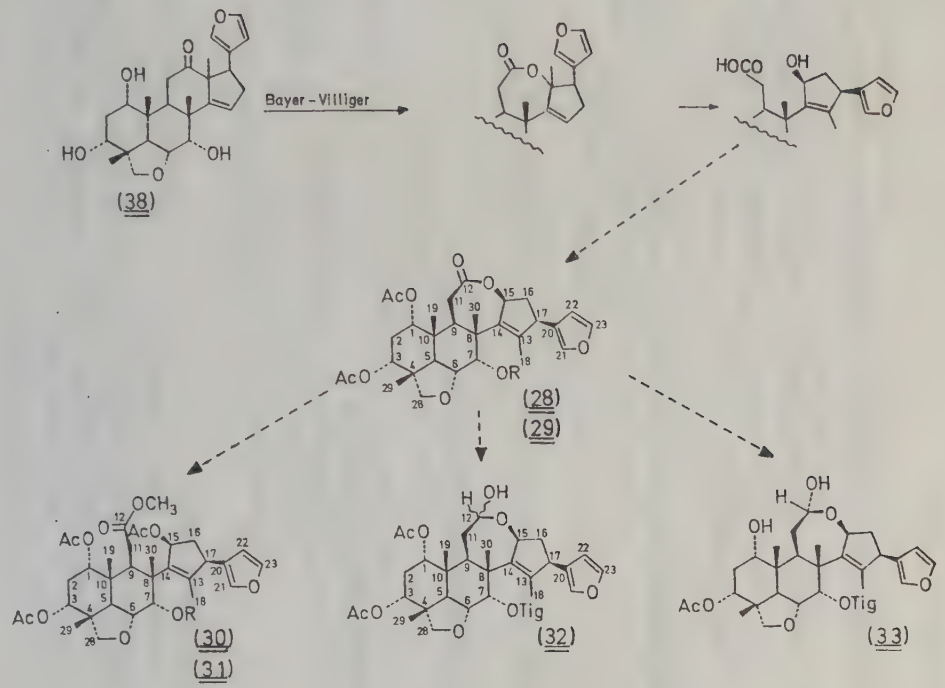
Auch das 1-Desacetylnimbolinin B (33) konnte nur amorph erhalten werden. Wasserstoffbrückenbindung der räumlich benachbarten Hydroxylgruppen an C-1 und C-12 führt zur Stabilisierung des α-Epimeren, das im Gleichgewicht nahezu ausschließlich vorliegt. Aus diesem Grunde sind im ^{13}C-NMR-Spektrum keine Signalverdopplungen zu beobachten. Durch NOE-Messungen konnte bewiesen werden, daß auch hier wie bei den Nimbolidinen und Ohchinoliden der Furanring β-ständig ist. Bei den Antifeeding-Tests ergab sich, daß das Fehlen der Acetoxygruppe an C-1 zu einem signifikanten Absinken der fraßhemmenden Wirkung führt. Während das Nimbolidin B (32) bei einer Konzentration von 0.01 % volle

Aktivität besitzt, ist beim 1-Desacetylderivat (33) bei dieser Konzentration keine fraßhemmende Wirkung mehr zu beobachten. Die Grenzkonzentration für völlige Fraßhemmung bei (33) beträgt 0.1 %. Es ist also um den Faktor 10 weniger wirksam als (32). Auch die übrigen Tetranortriterpenoide erwiesen sich im Fraßtest als stark wirksam. Die Grenzkonzentration für vollständige Fraßhemmung lag bei den Ohchinoliden (28) und (29) und beim Nimbolidin A (30) bei 100 ppm, beim Nimbolidin B (31) sogar bei 50 ppm.

Neben den Früchten aus Jugoslawien stand noch griechisches Pflanzenmaterial zur Verfügung, aus dem ebenfalls die Substanzen (28) - (33) isoliert werden konnten, sowie ein weiteres Salanninderivat, das in Anlehnung an das 3-Acetylohchinin (22) 3-Tigloylohchinin (37) genannt wurde.

Die Postulation zwei verschiedener Vorläufer bietet die Möglichkeit zur Erklärung der Biogenese der Substanzen (28) bis (33) mit β-ständigem Furanring und von (37) mit α-ständigem Furanring. Danach entstehen (28) bis (33) aus einem 12-Oxo-Tetranortriterpenoid, z.B. das Nimbidinin (38), (37) jedoch aus einem 12-Hydroxy-14,15-epoxyvorläufer, beispielsweise (40). Damit können alle isolierten Tetranortriterpenoide in das folgende biogenetische Schema eingeordnet werden.





(38)

(28)

(29)

(30)

(31)

(32)

(33)

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Verwendete Geräte

Infrarotspektren: Zeiss IMR-25 Infrarotspektrometer

^{1}H-NMR-Spektren: Bruker HX-90 R, WH-300[45] ($CDCl_3$, innerer Standart TMS)
Bruker WH-360[58].

^{13}C-NMR-Spektren: Bruker HX-90 R (22.63 MHz),
Bruker WH-300 (75.46 MHz) ($CDCl_3$, innerer Standart TMS)[42].

Massenspektren: Varian MAT 711[41] und MAT 312[64].

Hochaufgelöste Massenspektren:
Varian MAT 711[41] und MAT 312[64].

Dünnschichtchromatographie:
Material: Merck DC-Alufolien,
Kieselgel 60 F_{254}.
Entwicklung in Desaga-Trogkammern.

Säulenchromatographie:
Füllmaterial: Merck Kieselgel 60, 0.063 - 0.2 mm.
Fließmittel: Über Merck Molekularsieb oder neutralem Aluminiumoxyd Woelm N-Super I getrocknete Lösungsmittel, destilliert über Füllkorperkolonne.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie:
Analytische HPLC:
Pumpe: Orlita-Dreikopfmembrankolbenpumpe M3 S4.
Probenaufgabe: Waters Aufgabenschleife U6K.

Detektor: Schoeffel-UV-Spektrometer SF 770.

Säulen: Knauer-Stahlsäulen, gepackt mit Merck-LiChrosorb RP-18 (10 µm) und LiChrosorb Si 60 (7 µm).

Präparative HPLC:

Pumpe: Lewa-Doppelkolbenpumpe FD mit automatischer Pulsationsdämpfung.

Probenaufgabe: Latek Teflon Rotary Valve Typ 50.

Detektoren: UV-Festwellendetektor (254 nm) Pharmacia UV-1 und Waters Differentialrefraktometer R 403.

Säulen: Latek Glassäulen mit 400 x 25 mm Bettvolumen sowie Glassäulen 250 x 25 mm mit durchbohrten Teflonstopfen und D3-Fritten (System Glatz[70]).

Packungsmaterialien:
LiChroprep RP-18 (25 - 40 µm)
LiChroprep Si 60 (15 - 25 µm).

Drehwert: Perkin-Elmer 241 Polarimeter.

Schmelzpunkt: Büchi SMP 20. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

2. Pflanzenmaterial:

Das Pflanzenmaterial wurde in Osor und Poreč, Jugoslawien und in Athen gesammelt und an der Luft getrocknet.

3. Isolierung der Protolimonoide und des Scopoletins

3.1 Extraktion

6 kg getrocknete Früchte werden nach dem Entfernen der Stiele im einer Brabender Heumühle zu Pulver zermahlen und in zwei Chargen jeweils 48 h nach dem Soxhlet-Verfahren mit Petrolether 30 - 50° und anschließend 48 h mit Ether extrahiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels verbleiben 214 g Petroletherrohextrakt und 27 g Etherrohextrakt.

3.2 Verteilungschromatographie

Der Petroletherextrakt wird einer Flüssig-Flüssig-Verteilung im System Methanol/ Petrolether/ Wasser (45 : 50 : 5) unterworfen. Die Petroletherphase enthält Fette und Öle und wird verworfen (182g). Die methanolische Phase liefert nach dem Eindestillieren 31.3 g Rückstand. Dieser wird mit dem Etherextrakt vereint.

3.3 Säulenchromatographie der vereinigten Extrakte

Die Extrakte (Gesamtmenge 108.3 g) werden an 1.5 kg Kieselgel 60 (0.063 - 0.2 mm) mit Methylenchlorid/ Essigester-Gemischen steigender Polarität (95 : 5 ⟶ 20 : 80, dann reiner Essigester) in 8 Fraktionen aufgetrennt. Die Trennung wird dünnschichtchromatographisch mit Methylenchlorid/ Essigester (95 : 5, 90 : 10, 60 : 40 und 50 : 50) verfolgt.

3.3.1 Isolierung von Scopoletin (24) aus Fraktion 4

12.6 g Fraktion 4 werden an 420 g Kieselgel mit Petrolether/ Essigester (1 : 1) chromatographiert. Fraktion 3

(1.3 g) wird nach dem Eindestillieren mit Aceton aufgenommen, wobei (24) auskristallisiert. Umkristallisieren aus Aceton ergibt 50 mg Scopoletin, Schmp. 202°C (Lit.[30]: 206 - 207°C). Die Identifizierung gelang durch Vergleich der IR-und NMR-Daten mit denen der Literatur[30].

3.3.2 Isolierung von Melianon (25) aus Fraktion 5

Beim Einengen von Fraktion 5 kristallisiert Melianon (25) in weißen Schuppen aus. Umkristallisieren aus Aceton liefert 4.2 g, Schmp. 212 - 214°C, $\alpha_D^{21} = -65.1^\circ$ ($CHCl_3$, c = 1). [Lit.[17]: 223 - 224°C (Aceton-Pentan), $\alpha_D^{20} = -62^\circ$ ($CHCl_3$, c = 1), Lit.[37]: 212 - 214°C (Chloroform-Pentan)]. Die Identifizierung gelang durch Vergleich der IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Daten mit denen der Literatur[17].

3.3.3 Isolierung von Melianol (26)aus Fraktion 6

Fraktion 6 (4.55 g) wird durch Säulenchromatographie mit Ether/ Isopropanol(98 : 2)an 220 g Kieselgel weiter gereinigt. Aus Methanol kristallisieren 200 mg Melianol (26) aus. Schmp.: 188 - 189°C, $\alpha_D^{21} = -41.2^\circ$ ($CHCl_3$, c = 1), [Lit.[17]: 194 - 195°C, $^{20}_D = -38^\circ$ ($CHCl_3$, c = 1)]. Die Identifizierung gelang durch Vergleich der MS-, IR- und ^{1}H-NMR-Spektren mit denen der Literatur[17].

3.3.4 Isolierung von Melianodiol (27) aus Fraktion 7

Melianodiol (27) wird durch Chromatographie an 200 g Kieselgel mit Ether/ Isopropanol (98 : 2) angereichert. Aus Ether kristallisieren 700 mg Melianodiol, Schmp. : 222 - 224°C, $\alpha_D^{21} = -10.7^\circ$, aus (Lit.[71]: 219 - 222°C). Die Identifizierung gelang durch Vergleich der IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Spektren mit denen der Literatur[71].

4. Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29), der Nimbolidine A (30) und B (31), des Nimbolinin B (32) und des 1-Desacetylnimbolinin B (33)

4.1 Extraktion

Die Vorbereitung und Extraktion von 5kg Früchten erfolgt wie in 3.1 beschrieben. Es werden 190 g Petroletherextrakt und 43.2 g Etherextrakt erhalten.

4.2 Verteilungschromatographie und Aktivkohlebehandlung

Die Flüssig-Flüssig-Verteilung des Petroletherextrakts erfolgt wie in 3.2 beschrieben. Der Etherextrakt wird in 1000 ml Methanol gelöst, mit 15 g Aktivkohle 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und eindestilliert.

4.3 Säulenchromatographie des Etherextraktes und des Petroletherextraktes

Die methanolische Phase des Petroletherextraktes ergibt 21 g Destillationsrückstand, dessen Chromatographie an 1.5 kg Kieselgel 7 Fraktionen liefert. Als Fließmittel dienen Petrolether/ Essigester-Gemische (95 : 5 ⟶ 30 : 70). Fraktion 6 und 7 sind im Fraßtest am wirksamsten. Die Trennung wird dünnschichtchromatographisch mit Petrolether/ Essigester (95 : 5, 70 : 30, 50 : 50 und 30 : 70) verfolgt.

Der Rückstand des Etherextrakts (28 g) wird ebenfalls an 1.5 kg Kieselgel chromatographiert mit dem gleichen Fließmittel. Von den drei erhaltenen Fraktionen ist Fraktion 3 im Fraßtest am wirksamsten.

4.3.1 Isolierung der Ohchinolide A (28) und B (29)

Fraktion 3 (Etherextrakt) und 7 (Petroletherextrakt) werden vereinigt und ergeben zusammen 8.5 g. Zur Abtrennung unpolarer Bestandteile wird über eine mit 90 g RP-18, 25 - 40 µm (Merck) gepackte Säule mit Methanol/ Wasser (70 : 30) chromatographiert (Fluß: 12ml/min, Druck 8 Bar, UV-Detektion 254 nm und RI-Detektion). Anschließend wird an einer mit 125 g RP-18 gepackten Säule mit dem gleichen Fließmittel chromatographiert (Fluß: 9 ml/min, Druck 9 Bar, UV- und RI-Detektion). Es werden zunächst die Ohchinolide B (29) und A (28) eluiert.

Ohchinolid B (29): 170 mg, Schmp.: 211 - 212°C (Methanol), $\alpha_D^{20} = -46.5^\circ$, ($CHCl_3$, c = 1).

$C_{35}H_{44}O_{10}$: M^+ 624; Ber. 624.2934; Gef. 624.2935 (massenspektrometrisch).

MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 624 (64%, M^+); 525 (28%, M^+ minus Tiglinsäure); 281 (24%), 221 (39%), 161 (33%) und 146 (31%): Fragmente des Rings A; 244 (37%), 200 (20%), 174 (55%9 und 119 (20%): Fragmente der Ringe C, D und des Furan; 83 (99%), 55 (99%) und 43 (100%): Fragmente der Tiglinsäure.

IR (KBr): 3080 (Furan), 1735 (Estercarbonyl), 1280, 1255, 1050, 1020 (C-O), 875 cm^{-1} (Furan).

^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 7, Tab. 7.

^{13}C-NMR-Spektrum: Abb.5, Tab. 8.

Ohchinolid A (28): 160 mg, Schmp.: 230 - 231°C (Methanol), $\alpha_D^{20} = -42.5^\circ$, ($CHCl_3$, c = 1).

$C_{37}H_{42}O_{10}$: M^+ 646; Ber. 646.2777;Gef. 646.2771 (massenspektrometrisch).

MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 646 (53%, M^+); 525 (28%, M^+ minus Benzoesäure); 281 (15%), 221 (31%), 161 (34%) und 147 (33%): Fragmente des Ringes A; 245 (32%), 200 (17%), 174 (41%) und 119 (20%): Fragmente der Ringe C und D; 105 (99%), 77 (45%): Fragmente der Benzoesäure; 43 (100%, CH_3O^+).

IR (KBr) : 3190 (Furan),1740, 1720 (Estercarbonyl), 1260, 1055, 1030 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).

^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 6, Tab. 7.

^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 4, Tab. 8.

Als letzte Fraktion wird ein Gemisch (700 mg) aus (30) und (31) erhalten.

4.3.2 Trennung der Nimbolidine A (30) und B (31)

Die Trennung des Gemisches beider Nimbolidine erfolgt durch Chromatographie an LiChrosorb Si 100, 10 µ (Merck) mit Methylenchlorid/ Essigester (80 : 20) als Fließmittel. [Fluß: 6 ml/min, Druck 10 Bar, UV (254 nm)- und RI-Detektion].
Als erstes wird Nimbolidin A (30) eluiert. Eindestillieren und zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol liefern 160 mg.
Schmp.: 178°C (Methanol), α_D^{20} = - 32°($CHCl_3$, c = 1).
$C_{40}H_{48}O_{12}$: M^+ 720; Ber. M^+-60 (CH_3COOH) 660.2934,
Gef. 660.2939 (massenspektrometrisch).
MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 720 (5%, M^+); 660 (50%, M^+ minus CH_3COOH); 538 (8%, 660 minus Benzoesäure); 274 (10%), 200 (9%): Fragmente der Ringe A und B; 147 (12%) Fragment des Rings D mit Furan; 105 (100%) Benzoesäurefragment; 77 (21%) Aromat.
IR (KBr): 1740, 1730 (Estercarbonyl), 1270, 1250, 1235, 1060 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 21, Tab. 13
^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 23, Tab. 14

Nimbolidin B (31) wird als zweite Fraktion erhalten. Umkristallisieren aus Methanol ergibt 280 mg, Schmp. 180°C,
α_D^{20} = - 9.2° ($CHCl_3$, c = 1).
$C_{38}H_{50}O_{12}$: M^+ 698; Ber. M^+-60 (CH_3COOH) 638.3090,
Gef. 638.3103 (massenspektrometrisch).
MS: (70 eV): 698 (4%, M^+); 638, M^+ minus CH_3COOH); 539 (14%, 638 minus Tiglinsäure); 493 (12%, 638 minus Ring D); 274 (12%), 260 (11%), 200 (11%): Fragmente der Ringe A und B; 145 (24%), 119 (9%): Fragmente des Rings D mit Furan; 83 (100%) Tiglinsäurefragment.
IR (KBr): 1740, 1720 (Estercarbonyl), 1270, 1250, 1060 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 22 Tab. 13
^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 24 Tab. 14

4.3.3 Trennung von Nimbolinin B (32) und 1-Desacetylnimbolinin B (33)

Fraktion 6 aus dem Petroletherextrakt wird wie bei den Ohchinoliden (Kap. 4.3.1) beschrieben von unpolaren Inhaltsstoffen befreit. Nach dem Abziehen des Fließmittels bleiben 740 mg angereicherte Fraktion zurück, die sowohl die Nimbolidine (30) und (31), wie auch die Nimbolinine (32) und (33) enthält. Die Nimbolidine werden von den Nimbolininen durch zweimalige Chromatographie an LiChroprep Si 60, 15 - 25 µm und Methylenchlorid/ Äthanol (98 : 2) getrennt, wobei 80 mg eines Gemisches aus (30) und (31) und 200 mg (32) und (33) erhalten werden. Die beiden Nimbolinine (32) und (33) können durch Chromatographie auf der gleichen Säule mit Methylenchlorid/ Essigester (70 : 30) getrennt werden. Die Substanzen kristallisieren nicht. Deshalb wird zur Reinigung noch mehrmals an demselben Trennsystem chromatographiert. An Reinsubstanz erhält man schließlich 80 mg Nimbolinin B (32) und 80 mg 1-Desacetylnimbolinin (33).

Nimbolinin B: amorph, $\alpha_D^{20} = -55.5^o$ ($CHCl_3$), c = 0.91).
$C_{35}H_{46}O_{10}$: M^+ 626; Ber. 626.3090, Gef. 626.3103 (massenspektrometrisch), C-12-Epimerengemisch.
MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV) : 626 (33%, M^+); 608 (22%, M^+ minus H_2O); 526 (48%, M^+ minus Tiglinsäure); 508 (24%, 608 minus Tiglinsäure); 245 (52%), 199 (23%), 119 (23%): Ring C- und D-Fragmente; 161 (26%), 147 (98%): Ring A- und B-Fragmente; 83 (100%, Tiglinsäurefragmente).
IR (KBr): 3450 (OH), 1740, 1720 (Estercarbonyl), 1260, 1240, 1060 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 31 Tab. 17.
^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 30 Tab. 18

1-Desacetylnimbolinin B: amorph, $\alpha_D^{20} = -42.8^o$ ($CHCl_3$, c = 0.74).
$C_{33}H_{44}O_9$: M^+ 584; Ber. M^+-18 (H_2O) 566.2874, Gef. 566.2878 (massenspektrometrisch).

MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 584 (sehr schwach, unter 1%, M^+); 566 (1.4%, M^+-H_2O); 161 (8%), 147 (25%): Ring A und B Fragmente; 199 (6%), 119 (15%): Ring C und D-Fragmente; 83 (100%) und 55 (100%): Tiglinsäurefragmente.
IR (KBr): 3420 (OH), 1725 (Estercarbonyl), 1260, 1160, 1050 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 40, Tab. 20.
^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 39, Tab. 21.

5. Isolierung von 3-Tigloylohchinin (37) aus griechischen Früchten.

5.1 Chromatographie des Petroletherextrakts

Der wie in Kapitel 4.1 beschrieben erhaltene Petroletherextrakt (207.6 g aus 72 kg Früchten) wird an 4.5 kg Kieselgel mit Petrolether/ Essigester chromatographiert. Es werden die in Kapitel 4.2 beschriebenen Bedingungen eingehalten. In den beiden letzten von insgesamt 8 Fraktionen befinden sich die Tetranortriterpenoide (28) - (33). Fraktion 7 (13.4 g) enthält zusätzlich (37), das durch weitere chromatographische Trennungen unter Druck isoliert werden kann:

a) An LiChroprep Si 60, 15 - 25 µ, Fließmittel Methylenchlorid/ Äthanol (97:3): Es werden 205 mg an (37) angereicherte Fraktion erhalten.

b) 2x an LiChroprep Si 60, 15 - 25 µ, Fließmittel Methylenchlorid/ Essigester (80:20).

c) An LiChroprep RP-18, 25 - 40 µ, Fließmittel Methanol/ Wasser (80:20). Es werden 89 mg an (37) angereicherte Fraktion erhalten.

Umkristallisieren aus Essigester/ Pentan ergibt schließlich 40 mg 3-Tigloylohchinin (37): Schmp.: 125 - 130°C (Zers.). α_D^{20} = + 176° ($CHCl_3$, c=1).

$C_{41}H_{48}O_9$: M^+ 684; Ber. M^+ 684.32981, Gef. 684.32972 (massenspektrometrisch)
MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 684 (46%, M^+); 421 (14%); 283 (43%) 259 (14%); 173 (15%); 147 (16%); 131 (100%); 83 (64%); 55 (32%).
IR (KBr): 1735 (Methylestercarbonyl), 1710 (Estercarbonyl, konj.), 1638 (C=C, konj.), 1270, 1150, 1050 (C-O), 870 (Furan), 782, 770, 735, 710 cm^{-1}(Aromat).
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 41 Tab.22
^{13}C-NMR-Spektrum: Abb. 42 Tab. 23

6. Chemische Reaktionen zur Strukturaufklärung der Nimbolidine (30) und (31) und Ohchinolide A (28) und B (29)

6.1 Überführung der Ohchinolide A (28) und B (29) in die Ringöffnungsprodukte (34) und (35)

38 mg (0.06 mMol) Ohchinolid A (28) werden in 60 ml Methanol gelöst und mit 1.5 ml 1n KOH in CH_3OH/ H_2O (1 : 1) versetzt. Nach 1/2 h Reaktionszeit stellt man mit 0.1 n HCl auf pH 6 ein und engt im Rotationsverdampfer ein (Badtemperatur 25°C), bis sich eine Trübung zeigt. Anschließend setzt man 150 ml Wasser zu, extrahiert zweimal mit Methylenchlorid und trocknet über Na_2SO_4. Die Chromatographie an LiChroprep Si 60 (15 - 25 µm) mit Methylenchlorid/ Essigester (70 : 30) ergibt 14 mg (34%) (34), Schmp.: 190°C (Methanol).
$C_{38}H_{46}O_{11}$: M^+ 678, Ber. 678.3040, Gef. 678.3031 (massenspektrometrisch)[64].
^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 28 Tab. 15
IR (KBr): 3480 (OH), 1740 (Estercarbonyl), 1690, 1650 (C=C), 1272, 1250, 1235 (C-O), 880 cm^{-1}(Furan).

Aus 24 mg (0.038 mMol) Ohchinolid B (29) erhält man nach obiger Vorschrift 15 mg (60%) (35), Schmp.: 227 - 228°C (aus Methanol).

$C_{36}H_{48}O_{11}$: M^+ 656, Ber. 656.3197, Gef. 656.3192 (massenspektrometrisch)[64].

IR (KBr): 3480 (OH), 1735, 1728 (Estercarbonyl), 1690, 1650 (C=C), 1272, 1250, 1235 (C-O), 880 cm^{-1} (Furan).

^{1}H-NMR-Spektrum: Abb. 29 Tab. 15

6.2 Überführung der Ringöffnungsprodukte (34) und (35) in Nimbolidine (30) und (31)

14 g (0.02mMol) (34) löst man im 0.5 ml Pyridin, gibt 0.5 ml Acetanhydrid und eine Spatelspitze Dimethylaminopyridin[72] hinzu, schüttelt um und läßt bei Raumtemperatur 4 h stehen. Anschließend wird das Pyridin im Rotationsverdampfer i. Vak. abgezogen, der Rückstand noch zweimal in Toluol aufgenommen, einrotiert und über eine kleine Kieselgelsäule filtriert. Die Chromatographie an LiChroprep Si 60 (15 - 25 µm) mit Methylenchlorid/ Essigester (70 : 30) ergibt 7 mg (47%) (30). Die physikalischen Daten stimmen mit denen des Naturprodukts überein. Die Acetylierung von 15 mg (0.02 mMol) (35) nach obiger Vorschrift ergibt 4 mg (25%) (31). Die physikalischen Daten stimmen mit denen des Naturprodukts überein.

7. Chemische Reaktionen zur Strukturaufklärung von Nimbolinin B (32) und 1-Desacetylnimbolinin B (33)

7.1 Oxidation des Lactols (32)zum Lacton (29)

20.8 mg (0.05 mMol) Nimbolinin B (32) werden in 1 ml absol. Pyridin gelöst und zu einem aus 150 mg CrO_3 in 4 ml Pyridin hergestellten Komplex gegeben. Man rührt 24 h bei Raumtemperatur, versetzt mit 50 ml Wasser und stellt mit 0.1 n HCl auf pH 6 ein. Anschließend setzt man weitere 50 ml Wasser zu und extrahiert die wässrige Phase fünfmal mit Ether. Die organische Phase wird mit 0.1 n HCl und dann mehrmals mit Wasser

gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 und Abziehen des Ethers liefert die Chromatographie an LiChroprep Si 60 (7 µm) mit Ether/ Äthanol (98 : 2) 11 mg (30%) (29). Die physikalischen Eigenschaften stimmen mit denen des Naturprodukts überein.

7.2 Acetylierung von (32) und (33)

Zu einer Lösung von 30,8 mg (0.05 mMol) (32) in 0.5 ml absol. Pyridin werden 0.5 ml Acetanhydrid und eine Spatelspitze DMAP[72] gegeben. Danach wird umgeschüttelt und bei Raumtemperatur 4 h stehengelassen. Anschließend wird wie in 6.2 beschrieben aufgearbeitet. Es werden 25 mg (75%) amorphes Produkt erhalten.

MS: $\frac{m}{e}$ (70 eV): 608 (1%, M^+ - 60), 508 (1%, 608 - Tiglinsäure); 199 (2%), 173 (6%), 119 (10%): Fragmente der Ringe C und D und des Furan; 147 (14%): Ring A- und B-Fragmente; 55(100%), 83 (99%) Tiglinsäure; 60 (20%, CH_3COOH).

IR (KBr): 1740, 1725 (Estercarbonyl), 1250, 1230, 1055 cm^{-1} (C-O).

^{1}H-NMR-Spektrum: (90 MHz, $CDCl_3$)

δ =4.79 (1H, t, 1-H), 2.26 - 2.22 (2H, m, 2-H), 4.96 (1H, t, 3-H), 2.85 (1H, d, 5-H), 4.08 (1H, dd, 6-H), 5.80 (1H, d, 7-H), 3.17 (1H, d,9-H), 6.26 (1H, dd, 12-H), 4.96 (1H, m, 15-H), 2.35 (1H, m, 16-H), 3.14 (1H, d, 17-H), 1.75 (3H, s, 18-H), 1.05 (3H, s, 19-H), 7.25 (1H, m, 21-H), 6.38 (1H, m, 22-H), 7.34 (1H, m, 23-H), 3.43 (1H, d, 28-H), 3.53 (1H, d, 28-H), 1.19 (3H, s, 29-H), 1.46 (3H, s, 30-H), 6.95 (1H, qq, 3'-H), 1.82 (1H, dq, 4'-H), 1.92 (1H, d, 5'-H).

29 mg 1-Desacetylnimbolinin B (33) liefern 22 mg (66%) desselben Produkts.

8. Angaben zur Dünnschichtchromatographie

Die Reinheit der isolierten Substanzen wurde mittels Dü
schichtchromatographie überprüft. In Tabelle 24 sind die
mittelten RF-Werte zusammengefaßt.

Tabelle 24:

	RF - Werte		
	I	II	II
(28)	0.35	0.27	
(29)	0.33	0.26	
(30)	0.31	0.22	
(31)	0.33	0.18	
(32) α	o.21	0.21	0.2
β			0.1
(33)	0.17	0.08	
(37)		0.33	

I : Methylenchlorid/ Ethanol 97 : 3
II : Methylenchlorid/ Essigester 8 : 2
III : Ether/ Äthanol 98 : 2

Literatur

1) K. Kypke, Dissertation, Universität Hohenheim 1980.

2) W. Grimminger, Dissertation, Universität Tübingen 1978.

3) R. Cramer, Dissertation, Universität Tübingen 1979

4) First Neem Conferenz, Rottach-Egern, 16. - 18. Juni 1980.

5) H.U. Matern, Dissertation, Universität Münster 1972 S. 1-4, siehe hier auch weitere Literatur über die Verwendung von Melia azedarach in der Volksmedizin.

6) F.R. Morrison, R. Grant, J. Proc. Roy. Soc. New South Wales 65, 153 (1932).

7) R.F. Carratala, C.A. 33, 6951[5] (1939)

8) D. Lavie, M.K. Jain, S.R. Shpan-Gabrielith, Chem. Commun. 1967, 910.

9) J.H. Butterworth, E.D. Morgan und G.R. Percy, J. Chem. Soc. Perkin I, 1972, 2445.

10) P.R. Zanno, I. Miura, K. Nakanishi, D.L. Elder, J. Am. Chem. Soc. 97, 1975 (1975)

11) E.D. Morgan, M.D. Thornton, Phytochem. 12, 391 (1973).

12) R. Steets, Dissertation, Universität Gießen 1976.

13) "Pflanzenlexikon in 5 Bänden, Band 4, Rowohlt Verlag GMBH, Reinbeck bei Hamburg (1969), S. 816.

14) H.U. Matern, Lit.[5)] S. 5-9.

15)a) A. Engler, A. Prantl: "Die natürlichen Pflanzenfamilien", Bd. 19b, Index I, Wilhelm Engelmann Verl. Leizig (1940), S. 44.

b) R. Hegi: "Flora von Mitteleuropa" , Bd. V/1, Carl Hanser Verlag München (1965), S. 85 u. 86.

16) J.D. Connolly und K.H. Overton in "Chemistry of Terpenes and Terpenoids", Academic Press London and New York 1972, S. 214 - 220.

17) D. Lavie, M.K. Jain und I. Kirson, J. Chem. Soc. (C), 1967, 1347.

18) F.C. Chang und C.-K. Chiang, Chem. Commun. 1968 1156.

19)a) F.C. Chang und C.-K. Chiang, Tetrahedron Lett. 1969, 891.

b) C.-K. Chiang und F.C. Chang, Tetrahedron 29, 1911 (1973).

20)a) M. Ochi, H. Kotsuki, T. Tokoroyama und T. Kobuta, Bull. Chem. Soc. Jap. 50, 2499 (1977).

b) H. Nakai und M. Shiro, Acta Cryst. B 34, 2063 (1978).

21) J.I. Okogun, C.O. Fakunle, D.E.U. Ekong und J.D. Connolly, J. Chem. Soc. Perkin I 1975, 1352.

22) D. Lavie und E.C. Levy, Tetrahedron 27, 3941 (1971).

23) W. Grimminger, Lit.[2)], S. 9.

24) J.G.St.C. Buchanan und T.G. Hallsall, Chem. Commun. 1969, 48.

25) D.E.U. Ekong, C.O. Fakunle, A.K. Fasina und J.I. Okogun, Chem. Commun. 1967, 1166.

26)a) M. Ochi, H. Kotsuki, K. Hirotsu und T. Tokoroyama, Tetrahedron Lett. 1976, 2877.

b) M. Ochi, H. Kotsuki, H. Ishida und T. Tokoroyama, Chem. Lett. 1978, 99.

27) M. Ochi, H. Kotsuki, T. Kataoka, T. Tada und T. Tokoroyama, Chem. Lett. 1978, 331.

28) M. Ochi, H. Kotsuki und T. Tokoroyama, Chem. Lett. 1978, 621.

29) F. Shafizadeh und A.B. Melnikoff, Phytochemistry 9, 1311 (1970).

30) A.G. Gonzales, R. Estevez Reyes und J. Herrera Velasquez, Anal. de quim. 71, 437 (1975).

31) A.M. Khalil, M.A. Ashy, N.I. Tawfik und B.A.H. El-Tawil, Pharmazie 34, 106 (1979).

32) A.I. Gray und P.G. Waterman, Phytochemistry 17, 845 (1978).

33) F.M. Dean in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Springer Verlag Wien, New York 1952, Band 9, S. 225.

34) R.D.H. Murray in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Springer Verlag Wien, New York 1978, Band 35, S. 199.

35) A. Chatterjee, T. Chakrabortty und S. Chandrasekharan, Phytochem. 10, 2533 (1971).

36) Y. Inubishi und T. Hibino, Yukugaku Zasshi 90, 99 (1970), C.A. 72, 87187 z (1970).

37) J. Polonsky, Z. Varon, R.M. Rabanal und H. Jacquemin, Israel Journal of Chemistry 16, 16 (1977).

38) D.L. Dreyer, Tetrahedron 26, 5745 (1970).

39) M. Schwinger, Teil der geplanten Dissertation.

40) M. Ochi, K. Kotsuki, M. Ido, H. Nakai, M. Shiro und T. Tokoroyama, Chem. Lett. 1979, 1137.

41) Ich danke Herrn Dr. K.P. Zeller, Universität Tübingen, für die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren.

42) Ich danke Dr. P. Kunzelmann, Universität Heidelberg, für die Aufnahme der 75.46 MHz ^{13}C-NMR-Spektren.

43) E. Breitmeier und G. Bauer, "^{13}C-NMR-Spektroskopie", Thieme Verlag Stuttgart 1977, S. 31.

44) P.R. Zanno, Dissertation, Columbia University New York, 1974.

45) Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Schildknecht, Universität Heidelberg, für die Meßerlaubnis.

46) R. Henderson, R. Mc Crindle, A. Melera und K.H. Overton, Tetrahedron 24, 1525 (1968).

47) R.V. Pachapurka, P.M. Kornula und C.R. Narayanan, Chem. Lett. 1974, 357.

48)a) D. Lavie, E.C. Levy und M.K. Jain, Tetrahedron 27, 3927 (1971).

b) A. Alkisanya, C.W.L. Bevan, T.G. Halsall, J.W. Powell und D.A.H. Taylor, J. Chem. Soc. 1961, 3705.

c) S.A. Sutherland, G.A. Sim und J.M. Robertson, Proc. Chem. Soc. 1962, 222.

49) M. Harris, R. Henderson, R. Mc Crindle, K.H. Overton und D.W. Turner, Tetrahedron 24, 1517 (1968).

50) Programm PANIC der Fa. Bruker Physik, Karlsruhe.

51)a) L.M. Jackman und S. Sternhell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroskopy in Organic Chemistry", Pergamon Press 1969, S- 316 - 328.

b) H. Günther, "NMR-Spektroskopie", Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973, S. 124 - 126.

c) F.A. Bovey, "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press New York and London 1969, S. 143 - 145.

52) W.O. Godtfredsen, N. Rastrup-Andersen, S. Vangedal und W.D. Ollis, Tetrahedron 35, 2419 (1979).

53) H. Günther, Lit.[51b] S. 176.

54) H. Günther, Lit.[53b] S. 107 - 110 und F.A. Bovey, Lit.[53c] S. 129 - 131.

55) Ich danke Herrn Dr. P. Kunzelmann, Universität Heidelberg, für die Durchführung von NOE-Messungen.

56) J.H. Noggle and R.E. Schirmer, "The Nuclear Overhauser Effect", Chemical Applications, Academic Press New York and London 1971.

57) O. Adiwidjaja, B. Meyer, H. Paulsen und H. Thiem, Tetrahedron 35, 373 (1979).

58) Ich danke Herrn Dr. M. Feigel, Universität Bremen, für die Durchführung von NOE-Messungen.

59) Ich danke Herrn Prof. Dr. D.A.H. Taylor, University of Natal, Südafrika, für eine Probe Heudebolin.

60) G.A. Adesida und D.A. Okorie, Phytochemistry 12, 3007 (1973).

61) J.D. Connolly in "Terpenoids and Steroids", Vol 5, The Chemical Society London 1975, S. 133.

62) E. Breitmeier, W. Voelter, "^{13}C-NMR-Spectroscopy", Monographs in Modern Chemistry 5, Verlag Chemie Weinheim, New York 1978, S. 248.

63) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon, "Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden", Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1976, H 200.

64) Ich danke Frau M. Höhn, Varian MAT Bremen, für die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren.

65) R. Cramer, Lit.[3] S. 67 - 69.

66) D. Lavie, E.C. Levy und M.K. Jain, Tetrahedron 27, 3927 (1971).

67) C.R. Mitra, H.S. Garg und G.N. Pandey, Phytochemistry 10, 857 (1971).

68)a) C.A. Grob und P.W. Schiess, Angew. Chem. 79, 1 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 1 (1971).

b) Angew. Chem. 81, 543 (1969).

69) Ich danke Frau M. Schwinger für die Durchführung der Antifeeding-Tests und die Herstellung von Kontaktabzügen.

70) B. Glatz, Dissertation, Universität Stuttgart 1976, S. 102.

71) A. Merrien und J. Polonsky, Chem. Commun. 1971, 261.

72) G. Höfle, W. Steglich und H. Vorbrüggen, Angew. Chem. 90, 602 (1078), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17, 569 (1978).

L E B E N S L A U F

7. 9. 1951	Geboren in Paderborn; Vater: Josef Bokel, Bauingenieur Mutter: Elisabeth Bokel, geb. Bobbert.
1958 - 1962	Grundschule in Paderborn.
1962 - 1970	Gymnasium in Paderborn - Abitur.
WS 1970/ 71	Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Tübingen.
21. 9. 1971	1. Teil des Vordiploms der Biochemie.
1. 4. 1972 - 1. 6. 1973	Unterbrechung des Studiums, Wehrdienst.
WS 1973/ 74	Wiederaufnahme des Studiums der Biochemie.
30. 9. 1974	2. Teil des Vordiploms der Biochemie.
21. 2. 1975	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Tübingen.
April/Mai 1977	Diplom in Chemie.
Juli 1977 - Februar 1978	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. H.B. Stegmann über: "Versuche zur Darstellung von Schwermetallkomplexen mit paramagnetischen Liganden."
1978 - 1980	Dissertation bei Prof. Dr. W. Kraus.
seit August 1979	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Chemie der Universität Hohenheim.

Meine akademischen Lehrer waren - neben Prof. Dr. W. Kraus - Frau Prof. Dr. Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten:
Bayer, Braun, Breitmaier, Dähn, Guglielmi, Häfelinger, Hanack, Hoffmann, Jung, König, Krüger, Lindner, Mauser, Eu. Müller, Oelkrug, Pauschmann, Pausewang, Pracht, Rundel, Rieker , Rüdorff, Seelig, Stegmann, Suhr, Voelter, Weitzel, Weser, Zeil.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststraße 58 Telefon 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1